

Série A, n° 642

N° d'Ordre :

666

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS
MENTION SCIENCES

PAR

MARIE-THÉRÈSE MOREAU

1^{re} THÈSE

Recherches physico-chimiques sur l'hydrolyse diastasique du maltose

2^e THÈSE — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

soutenues le 11 Juin 1954 devant la Commission d'examen

MM. E. AUBEL, *Président*

R. WURMSER

A. DE CUGNAC

} *Examineurs*

Série A, n° 642

N° d'Ordre :

666

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS
MENTION SCIENCES

PAR

MARIE-THÉRÈSE MOREAU

1^{re} THÈSE

Recherches physico-chimiques sur l'hydrolyse diastasique du maltose

2^e THÈSE — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

soutenues le 11 Juin 1954 devant la Commission d'examen

MM. E. AUBEL, *Président*

R. WURMSER
A. DE CUGNAC

} *Examineurs*



FACULTE DES SCIENCES DE L'UNIVERSITE DE PARIS

Doyen... J. PERES

PROFESSEURS

JULIA..	T. Anal. Sup. et Alg. supérieure	FORTIER...	T. Méc. expér. des fluides
DENJOY.	T. Théorie des Fonctions	DANJON	T. Astronomie
LUTAUD	T. Géo. Phys. et Géol. dynamique	FROMAGEOT.	T. Chimie Biologique
DARMOIS	T. Enseignement de Physique	LAPORTE...	T. Phys. génér. et radioact.
LEVY...	T. Physiologie comparée	JANET	T. Méc. analyt. et Méc. céleste
CH.....	T. Méc. phys. et expérimentale	PETIT	T. Biologie maritime
UTHENIER	T. Electrotechnique générale	QUENEY	T. Météor. et dynam. atmosph.
BROGLIE	T. Théories physiques	GALLIEN ..	T. Biologie animale (P.C.B.)
B	T. Chimie générale	EICHHORN..	T. Biologie végétale (P.C.B.)
ENANT ...	T. Anatomie et Histol. comparées	DE CUGNAC.	T. Biologie végétale (P.C.B.)
RNIER...	T. Géométrie supérieure	Mlle CAUCHOIS	T. Chimie-Physique
RES	T. Mécan. des fluides et applic.	THELLIER..	T. Physique du Globe
UGIER...	T. Physiol. générale	AUDUBERT..	T. Electrochimie
CURIE..	T. Physique (P.C.B.)	L'HERITIER	T. Génétique
RIBAUD.	T. Hautes températures	GRIVET ...	T. Radio-Electricité
OZE	T. Phys. théor. et phys. céleste	PONCIN ...	T. Mécanique des fluides
PONT ...	T. Théories chimiques	THIRY	T. Mécanique appliquée
LIRON...	T. Calc. diff. et calc. Int.	DUBREIL ...	T. Arithm. et théorie des nombres.
RRABE ..	T. Géol. struct. et Géol. applic.	QUELET....	T. Chimie (P.C.B.)
DARMOIS	T. Calc. des prob. et Phys. math.	CAGNIARD .	T. Géophysique appliquée
BOURCART	T. Géog. phys. et Géol. dynam.	CHAMPETIER	T. Chimie macromoléculaire
BEL	T. Chimie biologique	CUVILLIER.	T. Géol. struct. et Géol. appl.
de JOLIO	T. Phys. génér. et radioactivité	JUNG	T. Pétrographie
CURIE		TRILLAT ..	T. Chimie Physique
ANTEFOL.	T. Botanique	WIEMANN ..	T. Chimie (M.P.C.)
BANNES..	T. Recherches physiques	JACQUINOT.	T. Physique (P.C.B.)
ASSE ...	T. Evol. des êtres organisés	VASSY	Physique de l'atmosphère
EVOST...	T. Chimie organique	DESTOUCHES	Théories physiques
ULIGAND.	T. Appl. de l'analyse à la Géom.	M. PRUVOST	T. Géologie
AUDRON..	T. Chimie appliquée	AMIEL	T. Chimie -(P.C.B.)
ART.....	T. Minéralogie	HOCART	T. Minéralogie
ISSIER..	T. Zoologie	J.P. MATHIEU	T. Physique (P.C.B.)
NGENOT..	T. Biologie végétale	COUTEAUX ..	Biologie animale (P.C.B.)
AUGER .	T. Phys. quantique et relativité	MAY	Biologie animale (P.C.B.)
NNIER...	T. Physiologie générale	FELDMANN..	Biologie (P.C.B.)
VETEAU..	T. Géologie	GUINIER ...	T. Physique (P.C.B.)
CARD....	T. Physique	JOST	T. Biologie (P.C.B.)
CARTAN.	T. Mathématiques (E.N.S.)	FORTET ...	Calcul des probabilités
FFITE...	T. Chimie générale	SCHWARTZ..	T. Méthodes Math. de la Phys.
VARD....	T. Mécanique générale	CHOUARD ..	T. Physiologie Végétale
ULOMB...	T. Physique du Globe	MALAVARD..	T. Aviation
Mlle COUSIN	T. Biol. Animale (P.C.B.)	BRELOT ...	T. Calcul différentiel
RETIEN..	T. Chimie minérale	NORMANT ..	T. Chimie (P.C.B.)
DRACH..	T. Zoologie	BENARD ...	Chimie (P.C.B.)
STLER ..	T. Physique	BUVAT	Botanique (E.N.S.)
HRUSSI..	T. Génétique	DUGUE	Statistique Mathématique
RMSEER...	T. Biol. physico-chimique	GELOSO ...	Chimie (S.P.C.N.)
VIERE ..	T. Géologie (P.C.B.)	SOULAIRAC.	Psychophysiologie.
UTHERET.	T. Biologie végétale (P.C.B.)	ULRICH ...	Physiologie Végétale
CAS	T. Physique	MARECHAL..	Optique théorique et appliquée
THOMAS.	T. Biologie Cellulaire		
NULF ...	T. Optique appliquée		
MORAND.	T. Physique		
LEILLET.	T. Physique		

Secrétaire Général Ch. MONIER.

RECHERCHES PHYSICO-CHIMIQUES SUR L'HYDROLYSE
DIASTASIQUE DU MALTOSE

par

Mademoiselle M.T. MOREAU

SOMMAIRE

	<u>Pages</u>
Introduction	
Historique	1
But du travail	16
Techniques	18
Etude de la marche de l'hydrolyse en fonction du temps	22
Etude de la cinétique de la réaction	49
Influence de la concentration en maltose	55
Influence de la concentration en enzyme	64
Action des inhibiteurs	71
Conclusion générale	79
Index bibliographique	81

I N T R O D U C T I O N

Les recherches faites sur l'hydrolyse diastasique du maltose par la maltase de la Taka-diastrase Parke et Davis (Londres) nous ont permis de mettre en évidence les traits essentiels de cette catalyse enzymatique qui effectue le clivage hydrolytique de la molécule de maltose.

Ce travail a été réalisé sous la direction de Madame de Grandchamp-Chaudun, chargée de recherches au C.R.N.S.

Nous remercions Monsieur le Professeur Aubel de l'honneur qu'il veut bien nous faire en acceptant de présider la soutenance de cette thèse et nous exprimons toute notre gratitude à Monsieur le Professeur Wurmser pour sa grande bienveillance et pour les conseils qu'il nous a donnés. Nous remercions Monsieur le Professeur de Cugnac pour l'accueil qu'il nous a réservé et nous exprimons toute notre affectueuse reconnaissance à Madame de Grandchamp-Chaudun.

H I S T O R I Q U E

A/- Premières recherches sur le maltose -

Les premières recherches sur le maltose remontent à 1847, date à laquelle DUBRUMFAUT (1) découvre le "glucose de malt" (obtenu par l'action du malt séché au four sur l'amidon) et s'échelonnent ensuite jusqu'en 1879, époque où ce sucre fut de nouveau étudié par O'SULLIVAN (2). On l'appela alors le maltose. MUSCULUS et GRUBER (3), en 1878-1879 trouvent également que l'amidon de pommes de terre, sous l'action d'une diastase provenant du malt donne, en plus du glucose, de la dextrine et du maltose. La même année, MUSCULUS et J. VON MERING (3) obtiennent les mêmes résultats, en faisant digérer l'amidon et le glycogène par la salive et l'extrait pancréatique d'un chien.

B/- Premiers essais d'hydrolyse enzymatique du maltose et découverte de la maltase -

1880 - Premiers essais faits par BROWN et HERON (5) qui utilisent de l'extrait de pancréas séché et de la paroi intestinale de porc coupée en lamelles, comme source d'enzyme.

1881 - VON MERING (6) observe la scission hydrolytique du maltose par la salive et par la diastase de malt.

- 1883 - BOUQUELOT (7) constate dans *Aspergillus Niger* la présence d'une diastase qui transforme le maltose en glucose.
- 1890 - O. KELLNER, Y. MORI et M. NAGOKA (8) trouvent dans *Aspergillus Oryzae*, une diastase semblable à la précédente et capable d'hydrolyser le maltose.
- 1894 - Première tentative faite par GEDUL (9) pour purifier l'enzyme hydrolysant le maltose. A cette diastase isolée dans des graines de céréales, il donne le nom de "glucase". ROLMANN (10) met également en évidence dans le sérum sanguin la présence d'une "glucase" qui hydrolyse le maltose en glucose.
- 1894-1895 -
- FISCHER (11) découvre qu'un extrait de levure de brasserie séchée est actif, non seulement sur le maltose, mais aussi sur le méthyl - D - glucoside, le glucose formé étant identifié par son osazone. Il appelle cet extrait "la maltase".

Les recherches se continuent alors parallèlement sous un double aspect : recherche des sources de maltase, extraction, purification, spécificité de l'enzyme d'une part, étude rationnelle des différents facteurs qui entrent en jeu dans l'hydrolyse diastasique du maltose, d'autre part.

C/- Sources de la maltase -

La maltase se rencontre aussi bien à travers toute l'échelle du règne animal que du règne végétal.

- 1 - chez les vertébrés on la trouve : a) dans de nombreux liquides de l'organisme, tels que l'urine, la bile, le sang, et une soigneuse étude de la maltase des leucocytes a été faite par WILLSTÄTTER et ROCHDEWALD (12).
b) dans tous les organes tels que le pancréas, les glandes salivaires, l'intestin, etc...
- 2 - chez les invertébrés, elle est aussi universellement répandue : on la rencontre chez les crustacés, les mollusques, les gastéropodes, et un travail très sérieux a été fait par M.H. BIERRY (13) sur la maltase du suc intestinal de l'*Helix*.
- 3 - dans le règne végétal, la maltase existe chez les phanérogames comme chez les cryptogames, le maïs est à ce point de vue la plante classique; les semences de sarrasin, les graines de soja hispida et d'autres légumineuses, *vicia sativa*, *fabula vulgaris*, *pisum sativum*, etc... sont signalées comme particulièrement riches en maltase; la pulpe fraîche de feuilles de capucines, de pommes de terre, de dahlias, de navets, etc... en renfermeraient beaucoup. Sa présence a été reconnue dans une foule de microorganismes, bactéries, levures, moisissures et particulièrement *Aspergillus oryzae* dont on retire la taka-maltase.

D/- Extraction et purification -

Les deux grandes sources de maltase utilisées dans les laboratoires sont, d'une part, la levure de brasserie, d'autre part la taka-diastrase provenant d'*Aspergillus oryzae*.

1) Maltase de levure. WILLSTÄTTER et BAMANN (14) triturèrent la levure de brasserie avec des cristaux de phosphate d'ammonium après l'avoir passée à la presse mais obtiennent de meilleurs résultats en faisant l'autolyse de la levure en présence d'éther acétique (1 cm³ pour 10 grs. de levure) et en neutralisant constamment l'acidité du milieu par l'ammoniaque durant le cours de l'opération. La séparation de la maltase d'avec la saccharase ou l'amylase qui l'accompagnent est difficile et c'est par adsorption qu'elle est réalisée. Les autres utilisent à cet effet la propriété que possède $Al_2O_3 \cdot H_2O$ (obtenu par l'action de l'ammoniaque à 250° sur $Al(OH)_3$) d'adsorber fortement la maltase et très peu la saccharase. L'adsorption une fois faite, une solution étendue de phosphate monopotassique (pH - 4,8) libère la saccharase seule, après filtration, la maltase est détachée par un mélange de phosphates à pH - 6,8.

2) Taka-diastrase. La culture d'*Aspergillus oryzae* (Mucédinées) se fait sur milieu Czapek glucosé. Au bout de 4 à 5 jours, quand le mycélium commence à sporuler, on décante le liquide de culture et on le remplace par de l'eau. Après diffusion des ferments dans l'eau, on obtient un liquide actif riche en taka-diastrase. Fiegenbaum (15)

obtient la maltase contenue dans la taka-dia-
stase en la dialysant et en détruisant la saccharase présente par Na_2SO_4 .

E/- Spécificité de la maltase, et essais de classification
des différentes maltases -

Pour tous les auteurs, le substrat biologique de l'enzyme est le maltose (α -D-glucosido-4-d-glucose) et la maltase est une glucosidase qui scinde la liaison glucosidique, mais les points de vue divergent lorsque, considérant les deux grands groupes de maltases, maltases de levure et taka-maltases, la question de la spécificité liée à celle d'une classification basée sur cette dernière, se pose.

Pour LEIBOVITZ (16) les maltases de levure seraient des glucosido-maltases dont la spécificité ne porterait que sur la partie non réductrice, de la molécule de maltose. Cette spécificité serait une spécificité très large et ces maltases possèderaient un haut degré de tolérance envers les changements de structure de l'aglycone, et seraient capables d'hydrolyser les α -D-glucosides, quelle que soit la nature chimique de l'aglycone auquel le sucre est uni par une liaison α -D-glucosidique. Elles agiraient sur presque tous les dérivés du maltose tels que les maltosides (FISCHER-ARMSTRONG) (17) l'acide maltobionique, la maltosazone (NEUBERG, HOFMANN) (18).

Les taka-dia-
stases seraient des α -glucomaltases, dont la spécificité n'intéresserait que la moitié réductrice

de la molécule de maltose, et ne supporteraient aucun changement de structure dans l'aglycone. Elles auraient ainsi une spécificité beaucoup plus restreinte que celle des maltases de levure et seraient sans effet sur les α -D-glucosides (hétérosides) puisque le groupe réducteur, une fois transformé, elles n'auraient plus aucune prise sur la molécule.

Mais, de nombreuses recherches faites par R. WEIDENHAGEN (19), H. PRINGSHEIM et F. LOEW (20), S. HESTRUM (21), NEUBERG et HOFMANN (22), FISCHER (23) ont montré qu'une classification basée sur la spécificité relative des maltases envers le moitié réductrice de la molécule ou envers l'aglycone, ne pouvait être retenue, car, d'une part, le degré de spécificité des différentes maltases varie d'une manière imprévisible, en relation sans doute avec la structure enzymatique, et, d'autre part, la différence de spécificité indiquée par LEIBOVITZ n'était pas réellement confirmée d'une façon expérimentale.

Ce qui est certain aujourd'hui, c'est que :

- 1^o) les différentes maltases ne sont pas chimiquement identiques comme le prouvent leurs différences de pH optimum, de thermolabilité, de résistance aux acides.
- 2^o) qu'elles établissent, quelles que soient leurs sources, un contact étroit entre la moitié non réductrice de la molécule de maltose et de ses dérivés, et qu'il est probable que l'oxygène glucosidique des groupes 2, 4 et 6 a une action dans la formation du complexe enzyme-substrat.

3^e) que le contact entre la protéine de l'enzyme et l'aglycone varie, d'une part selon les modifications légères de la structure chimique de l'apoenzyme, d'autre part, selon la nature chimique de l'aglycone, le contact étant d'autant plus étroit qu'il existe une analogie de structure entre l'aglycone et la protéine enzymatique.

Ainsi, on ne peut actuellement donner de classification des maltases, et on désigne celles-ci d'après leur origine, comme FISCHER le proposait. Une sous-classification des maltases ne sera possible, que lorsque des expériences faites sur un grand nombre de maltases, provenant de sources variées et agissant sur de nombreux dérivés du maltose, et des glucosides permettront de mettre en évidence des types distincts de réactions, donnant alors la possibilité de grouper les maltases d'une façon rationnelle.

F/- Recherche des lois de l'hydrolyse diastasique du maltose -

ARMSTRONG (24) dans un mémoire publié en 1904, note "que la vitesse d'action de la maltase est moins rapide que ne l'indique la loi logarithmique". En 1908, dans sa thèse intitulée "Recherches physico-chimiques sur l'amylase et la maltase", Mademoiselle PHILOCHE étudie successivement l'influence de la concentration en enzyme, l'influence de la concentration en substrat, et la loi de la vitesse de réaction.

Ses résultats relatifs à l'influence de la concen-

tration en enzyme et à l'influence de la concentration en substrat sont les suivants :

1^o) pour des concentrations de taka-diastrase comprises entre 1 gr. pour 1000 et 1 gr. pour 100, la vitesse est proportionnelle à la concentration du ferment.

2^o) pour des concentrations en maltose comprises entre 2 gr. et 8 gr./100, les quantités de glucose formées après des temps donnés sont les mêmes, c'est-à-dire que, dans ces limites de concentration en substrat, la vitesse absolue est indépendante de la concentration.

3^o) pour de plus faibles concentrations en maltose la vitesse absolue croît quand on augmente la concentration de ce sucre (ces résultats ajoute Mademoiselle PHILOCHE ont été obtenus par E.F. TERROINE dans les laboratoires de physiologie de la Sorbonne).

Elle recherche alors si la loi empirique trouvée par V. HENRI pour l'invertine $2 k_1 = \frac{1}{t} \log \frac{a+x}{a-x}$ s'applique bien à l'action de la maltase sur le maltose. Elle constate que pour une expérience donnée les valeurs de $2 k_1$ restent à peu près constantes, pendant toute la durée de l'expérience mais que la valeur de $2 k_1$ varie avec la concentration initiale comme le montrent les résultats des séries suivantes :

Maltose	8%	6%	4%	2%
$2k_1$	0,00108	0,00139	0,00212	0,00551

C'est pourquoi elle écrit "qu'à ce point de vue la formule $2K_1 = \frac{1}{t} \left(\frac{a+x}{a-x} \right)$ ne représente pas bien l'action de la maltase".

Ces résultats d'ailleurs concordent bien avec ceux trouvés par Victor HENRI pour l'inversion du saccharose car ce dernier écrit dans sa thèse "Loi générale des diastases" (1903) page 59 "lorsqu'il s'agit de représenter la marche d'une inversion depuis le début jusqu'à la fin, produite par l'invertine, $2 k_1 = \frac{1}{t} \log \left(\frac{a+x}{a-x} \right)$ donne une valeur constante suffisante, mais l'expression présente le défaut de varier lorsqu'on passe d'une concentration de saccharose à une autre".

Mais les résultats de Mademoiselle PHILOCHE sont différents de ceux de Victor HENRI quand elle recherche si le sucre provenant de l'hydrolyse du maltose agit de la même façon que le glucose pur ajouté au début de la réaction.

Victor HENRI a montré que l'expression $2 k_1 = \frac{1}{t} \log \left(\frac{a+x}{a-x} \right)$ devient dans le cas où on ajoute du glucose au début de la réaction $2 k'_1 = \frac{1}{t} \log \left(\frac{a+2g+x}{a-x} - \log \frac{a+2g}{a} \right)$ et a trouvé une concordance complète entre les valeurs de $2 k_1$ qu'il fasse agir l'invertine sur du saccharose pur ou sur du saccharose additionné de quantités plus ou moins grandes de sucre interverti, alors que Mademoiselle PHILOCHE, pour le maltose écrit "dans le cas d'addition de glucose au début de la réaction les valeurs de $2 k'_1$ augmentent et au contraire les valeurs de $2k_1$ calculées comme s'il n'y avait pas de glucose restent à peu près constantes.

Après avoir vérifié que pour des solutions de concentrations moyennes la formule de Bodenstein exprimée par $k_2 = \frac{a}{t} \left(\frac{2x}{a} + \frac{\ln a}{a-x} \right)$ lui donne des résultats satisfaisants, elle conclut ainsi "en première approximation, la formule de Bodenstein représente donc assez bien l'action de la maltase sur le maltose pour des concentrations moyennes".

La cinétique de l'hydrolyse diastasique du maltose est de nouveau étudié en 1920 par WILLSTÄTTER, F. OPPENHEIMEN, W. STEIBE (26), en 1924 par WILLSTÄTTER, R. KUHN et H. SOBOTKA (27), en 1926 par WILLSTÄTTER et BAMANN (28) et en 1926 également par ISAIEV (29).

On peut résumer dans les conclusions suivantes les résultats de tous ces travaux successifs :

1^o) pour des concentrations basses et moyennes de l'enzyme, la vitesse d'hydrolyse est proportionnelle à la concentration enzymatique, mais pour de plus grandes concentrations, la vitesse serait proportionnelle à la racine carrée de la concentration enzymatique (ce dernier résultat ayant été donné par Isaiev).

2^o) aucune relation simple n'a pu être observée entre la vitesse de la réaction et la concentration du substrat, la marche de l'hydrolyse étant différente suivant la teneur des solutions en enzyme en substrat et en produits de la réaction (WILLSTÄTTER et BAMANN (28), WILLSTÄTTER, OPPENHEIMEN, STEIBEL (26)).

3^e) l'effet de la concentration du maltose sur la vitesse de la réaction ne peut être exprimée adéquatement par l'équation :

$$kt = \left\{ \frac{1}{a} + \frac{2}{kg} \right\} a \ln \frac{a}{a-x} + \left\{ \frac{1}{km} - \frac{2}{kg} \right\} x \quad (30)$$

kg et km étant les constantes de dissociation respectives des composés maltase-glucose, maltase-maltose, a et a - x, les concentrations molaires respectives du maltose au temps 0 et au temps t. Ceci résulte des travaux faits par ISAIEV et présentés dans le tableau suivant (29) :

Test de la validité de l'équation de MICHAELIS et MENTEN,
pour l'hydrolyse enzymatique du maltose.

Temps en minute	Valeurs de $K \times 10^3$ pour les concentrations en maltose de				
	0,025 M	0,05 M	0,10 M	0,20 M	0,40 M
	A) Concentration enzymatique 1 % $K_m = 0,1513$ $K_g = 0,1784$				
10	1,68	1,46	1,85	1,94	1,79
20	1,72	1,80	1,91	1,98	1,97
30	2,08	1,90	1,98	2,07	2,02
45	1,82	1,93	2,01	2,35	2,10
90	1,76	1,94	2,09	2,24	1,92
180	1,34	1,51	1,75	1,97	1,83

Temps en minute	Valeurs de $K \times 10^3$ pour les concentrations en maltose de				
	0,025 M	0,05 M	0,10 M	0,20 M	0,40 M
B) Concentration enzymatique 8 % $K_m = 0,1995$ $K_g = 0,01784$					
10	4,21	4,35	5,47	5,37	5,67
20	3,97	4,11	5,34	5,45	5,41
30	4,00	4,40	5,05	5,61	6,75
45	4,19	4,69	5,66	6,39	7,36
60	4,43	4,91	6,06	6,39	7,84
90	4,83	7,26	7,13	8,56	9,12
180	6,69	8,46	11,63	11,58	14,29
C) Très haute concentration enzymatique $K_m = 0,1513$ $K_g = 0,0178$					
10	-	41,1	42,5	43,1	34,3
20	-	32,2	37,4	34,0	22,2
30	-	27,8	30,4	29,8	19,6
45	-	25,2	27,4	27,1	18,2
60	-	23,8	25,6	25,6	16,7
90	-	23,6	25,3	24,8	13,7
180	-	19,2	19,9	18,9	10,2

A. GOTTSCHALK (31) faisant l'analyse de ce test écrit : "Durant la première moitié de l'hydrolyse et avec une basse concentration enzymatique, les valeurs de k sont à peu près stables (tableau A), avec une plus forte concentration

enzymatique k s'élève après une période constante (tableau B), avec une très haute concentration enzymatique les valeurs de k ont une tendance marquée à tomber au fur et à mesure que la réaction avance (tableau C)".

Il en tire la conclusion suivante "Il apparaîtrait d'après ces résultats que la dissociation des complexes maltase-maltose et maltase-glucose, ne correspond seulement que d'une façon très approximative à la dissociation des acides faibles".

4^e) la concentration du composé intermédiaire maltase-substrat est le facteur majeur déterminant la vitesse d'hydrolyse (WILLSTÄTTER, KUHN, SOBOTKA (27)).

Ainsi devant tous ces résultats expérimentaux, A. GOTTSCHALK (31) constate "que l'équation

$$kt = \left\{ \frac{1}{a} + \frac{2}{kg} \right\} a \ln \frac{a}{a-x} + \left\{ \frac{1}{km} - \frac{2}{kg} \right\} x \quad (30)$$

ne traduit pas exactement les lois de l'hydrolyse enzymatique du maltose, et, que d'autres facteurs doivent avoir un certain rôle dans le contrôle de la réaction, facteurs pour lesquels rien n'est prévu dans cette équation".

G/- Recherches sur l'action des inhibiteurs -

ARMSTRONG (24) en 1904 constate, pour la première fois, que le glucose inhibe fortement l'hydrolyse enzymatique du maltose, Mademoiselle PHILOCHE en 1908 (25) constate de même que le glucose ralentit l'action de la maltase sur le maltose, et, remarque que le retard est d'autant plus grand

que le rapport $\frac{\text{maltose}}{\text{glucose}}$ est plus petit : ainsi 2 % de glucose retarde plus l'hydrolyse d'une solution à 2 % de maltose que celle d'une solution à 4 %. Des essais d'hydrolyse du maltose par la taka-diaстase, en présence de doses croissantes de lévulose, l'amènent à constater que ce sucre retarde également l'action de la maltase, plus que ne le fait le glucose, dans des proportions identiques, et elle conclut en disant "on voit donc que les produits de la réaction n'interviennent pas d'une façon particulière et exclusive mais que la réaction est modifiée par leur présence comme elle l'est par toute une série d'électrolytes qui influencent la formation des composés d'adsorption".

HERZOG (32) en 1913 trouve aussi que le D-fructose inhibe l'action de la maltase.

ISAIIEV (29) en 1926, recherche de nouveau les effets du glucose, du D-fructose et du D-galactose, sur l'hydrolyse enzymatique du maltose. Ses travaux lui permettent de voir que le glucose inhibe plus que le fructose, (ses résultats étant en contradiction avec ceux de Mademoiselle PHILOCHE), mais que le D-galactose n'aurait aucun effet inhibiteur.

GOTTSCHALK en 1943, pense trouver une explication aux retards dus au glucose et au fructose en s'appuyant sur des analogies de structure. Le glucose, sous sa forme pyranique, le fructose sous sa forme furanique présenteraient des groupes hydroxyles qui pourraient être mis en contact avec la protéine enzymatique d'une façon similaire au groupe hydro-

xyle des carbones du maltose, le glucose et le fructose seraient ainsi des inhibiteurs compétitifs; par contre le D-galactose sous sa forme pyranique ne serait pas un inhibiteur compétitif car, il ne posséderait pas, en particulier, sur le carbone 4 un groupe hydroxyle capable de réagir sur l'apoenzyme.

BUT DU TRAVAIL

La constatation essentielle qui se dégage des travaux faits jusqu'à ce jour sur l'hydrolyse diastasique du maltose est la suivante : la marche de l'hydrolyse est différente selon les degrés de concentration en enzyme et en substrat, et les résultats obtenus dans les plus récents travaux n'ont pas permis de "trouver une relation simple entre la vitesse de la réaction, la concentration du substrat et la concentration enzymatique. (Les Enzymes - chemistry and mechanism of action. B. Summer et Myrbach p.540, tome I, 1952).

Il nous a donc semblé qu'il n'était pas sans intérêt de reprendre la question d'une façon systématique à la lumière des connaissances et des théories actuelles afin :

1^o) de déterminer les différentes zones dans lesquelles suivant le rapport des concentrations enzyme/substrat la réaction évolue au cours du temps.

2^o) de préciser le facteur jouant un rôle dans la détermination de ces zones.

3^o) de vérifier dans ces différentes zones la cinétique de la réaction et de chercher dans chacune d'elle l'influence de la concentration en enzyme et de la concentration en substrat.

Pour cela nous avons étudié :

- 1^o) l'hydrolyse en fonction du temps.
- 2^o) l'influence de la concentration en substrat
- 3^o) l'influence de la concentration en enzyme.

Nous avons ajouté l'étude de l'action des produits de la réaction sur la marche de l'hydrolyse et celle de certains inhibiteurs tels que le fructose et le galactose pour vérifier dans quelle mesure ils entraient en compétition avec le substrat.

T E C H N I Q U E S

Le matériel utilisé a été du maltose d'une pureté absolue (offert généreusement par les Laboratoires Toraude) et la source de maltase, la Taka-diaстase, préparée par Parke et Davis (Londres). Celle-ci se présente sous la forme d'une poudre très fine légèrement colorée se dissolvant rapidement dans l'eau.

A/- Essais préliminaires -

Les essais préliminaires ont eu pour but de déterminer :

- 1^o) les meilleures conditions de concentration du milieu en ions hydrogène.
- 2^o) la température favorisant le mieux l'action diastasique.

1^o) Détermination du pH -

L'enzyme agit bien pour des pH compris entre 4 et 5, la vitesse de la réaction devenant beaucoup trop faible, pour permettre des mesures exactes, lorsqu'on ne maintient pas le pH des solutions dans ces limites.

2^o) Température optimum -

Une série d'expériences réalisées à des températures comprises entre 20 et 60°, m'a permis de constater :

1^o) que l'hydrolyse est très lente au-dessous de 28 à 30°,

2^o) que l'activité de l'enzyme est maximum entre 37 et 39°, qu'elle diminue progressivement à mesure que la température s'élève davantage et disparaît au-dessus de 50°. Il n'en faudrait pas conclure, pour autant, que la diastase ait été complètement détruite à cette température, car, ramenée à 39° et maintenue pendant une dizaine d'heures, au moins, à cette température, elle manifeste à nouveau une certaine activité. Par contre, si on atteint la température de 60°, il n'y a pas régénération du pouvoir diastasique par refroidissement. D'autre part, sans que j'aie pu en déterminer la raison, j'ai vérifié que l'activité de la solution diastasique est accrue, lorsqu'on la maintient pendant 10 à 12 heures à la température de 37 à 39°, avant de l'utiliser dans les expériences d'hydrolyse.

B/- Méthodes de dosages

Pour déterminer à chaque instant le pourcentage de maltose hydrolysé, deux procédés peuvent être utilisés : la méthode polarimétrique et la méthode de dosage des sucres réducteurs par la liqueur de Fehling.

1^o) Méthode polarimétrique -

C'est la méthode employée le plus généralement et

qui, lorsque les liqueurs sont suffisamment claires, donne les meilleurs résultats.

Si : a est la concentration initiale du substrat (en grammes pour 100 cm³)

α_0 = la lecture initiale

α'_0 = la lecture finale

α_t = la lecture au temps t

x = la quantité en grammes pour 100 cm³ hydrolysée au temps t , est donnée par

$$x = a \left(\frac{\alpha_0 - \alpha_t}{\alpha_0 - \alpha'_0} \right)$$

Il faut évidemment tenir compte des perturbations que peut produire la mutarotation des produits d'hydrolyse, mais il est facile de se mettre à l'abri des causes d'erreurs qu'entraînerait ce phénomène secondaire, en introduisant avant chaque lecture, une trace d'alcali dans les solutions en voie d'hydrolyse.

2°) Méthode de dosage des sucres réducteurs par la liqueur de Fehling (Dosage Bertrand) -

Dans le problème qui nous occupe, il faut noter que le maltose et le glucose qui résulte de l'hydrolyse, sont tous deux réducteurs, mais à des degrés différents.

Si : v_0 , est le volume de permanganate correspondant au dosage initial, v'_0 le volume de permanganate correspondant au dosage final.

v_t : le volume de permanganate correspondant au dosage au temps t

x : la quantité de maltose hydrolysé au temps t est donnée par :

$$x = a \left(\frac{v_t - v_0}{v'_0 - v_0} \right)$$

Malgré les inconvénients inhérents à cette méthode de dosage, je l'ai jugée préférable à la méthode polarimétrique pour la raison suivante :

L'hydrolyse du maltose ne s'effectue, avec une vitesse suffisante pour permettre sa mesure exacte, qu'aux environs de 39°; dans ces conditions :

- 1) le refroidissement de la solution lors de son introduction dans le tube polarimétrique
- 2) le réchauffement non instantané du liquide remis au bain-marie,

introduiraient des causes d'erreurs non négligeables dans la détermination des vitesses.

C/- Méthode expérimentale

Toutes les hydrolyses ont été effectuées à la température optimum de 39°, et à pH 4,5. La solution diastasique ayant été maintenue pendant 10 heures au bain-marie à 39° est mélangée à la solution de maltose préalablement portée à la même température; le matras contenant le mélange est laissé au bain-marie pendant toute la durée de l'hydrolyse. Les prises d'essais pour les dosages Bertrand y sont faites directement et, dès le début de l'expérience, l'introduction d'un cristal de thymol, évite la contamination possible du milieu.

I

ETUDE DE LA MARCHE DE L'HYDROLYSE EN FONCTION DU TEMPS

Dans l'étude de l'hydrolyse en fonction du temps nous avons particulièrement essayé de voir en opposant la même quantité d'enzyme à des doses croissantes de substrat :

1^{re}) Dans quelles conditions de concentration en enzyme et en substrat, nous avions une zone d'ordre 0.

2^{de}) La durée de cette zone quand elle existait.

3^{de}) La quantité de maltose non hydrolysé restant en solution quand la réaction cessait d'appartenir à une cinétique d'ordre 0. Autrement dit, nous avons recherché la concentration du substrat pour laquelle on obtenait la vitesse maximum de la catalyse enzymatique.

A cet effet, les trois séries d'expériences suivantes dans lesquelles la concentration enzymatique E est constante, la seule variable étant la concentration du substrat ont été réalisées :

1 ^{ère} série	: maltase	1 %	Maltose	: 6 gr	%
				4 "	%
				2 "	%
				1 gr	%
				0gr50	%
2 ^{ème} série	: maltase	0gr.66 %	Maltose	: 4 gr	%
				2 "	%
				1 "	%
				0gr50	%

3ème série : maltase Ogr.50 % Maltose : 4 gr %
2 gr %
1 " %
Ogr50 %

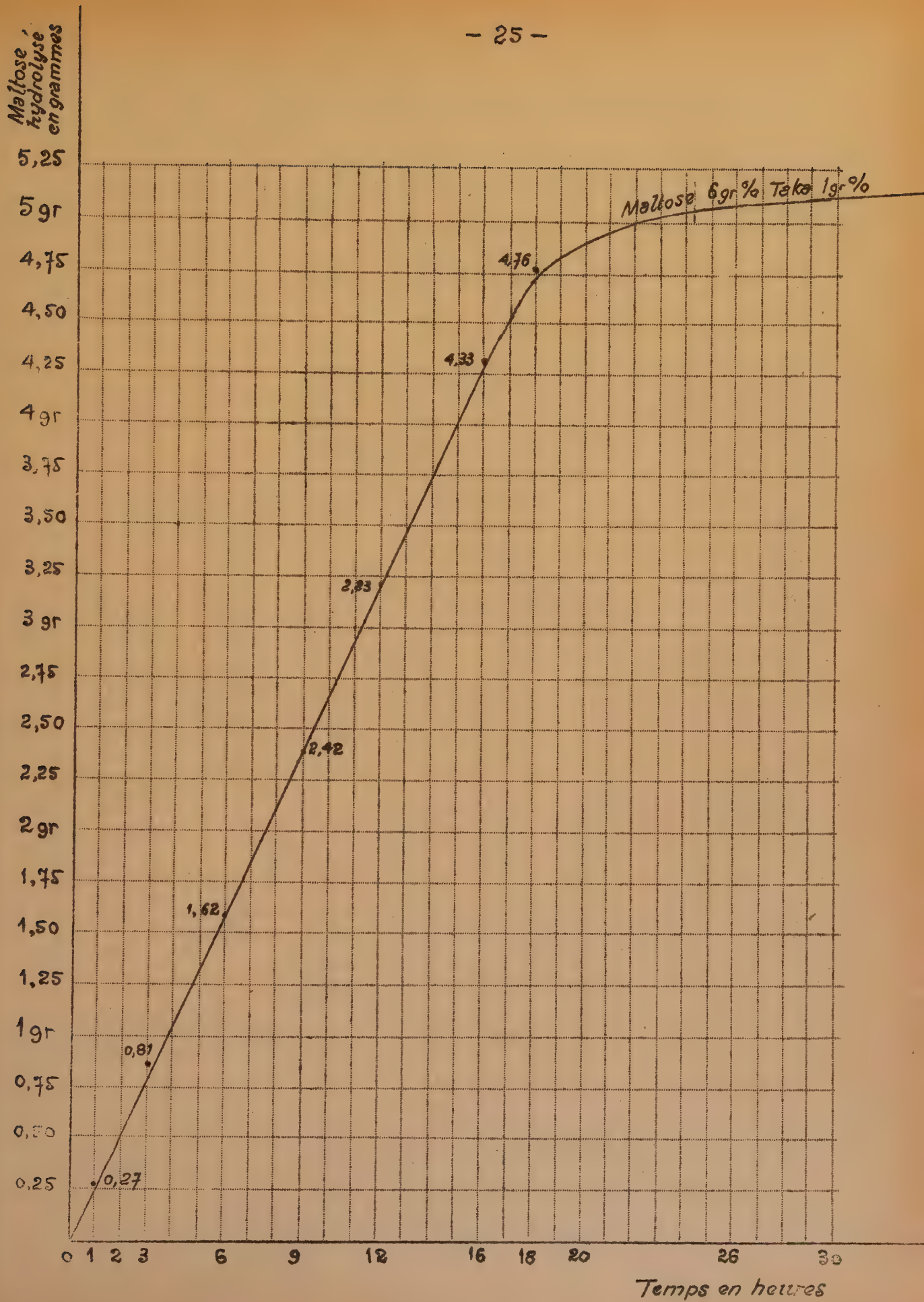
Les tableaux ci-dessous présentent les résultats obtenus.

La première colonne donne ne heures la durée du contact, la deuxième colonne la quantité x de maltose hydrolysé exprimée en gr. pour 100 cm³ de solution. La troisième colonne donne $X_{(t+1)} - X_t$ c'est-à-dire les quantités de maltose disparues pendant l'unité de temps. (Voir tableaux et courbes qui traduisent les résultats obtenus).

PREMIERE SERIE D'EXPERIENCES = Dose d'enzyme = 1 gr %

T A B L E A U I

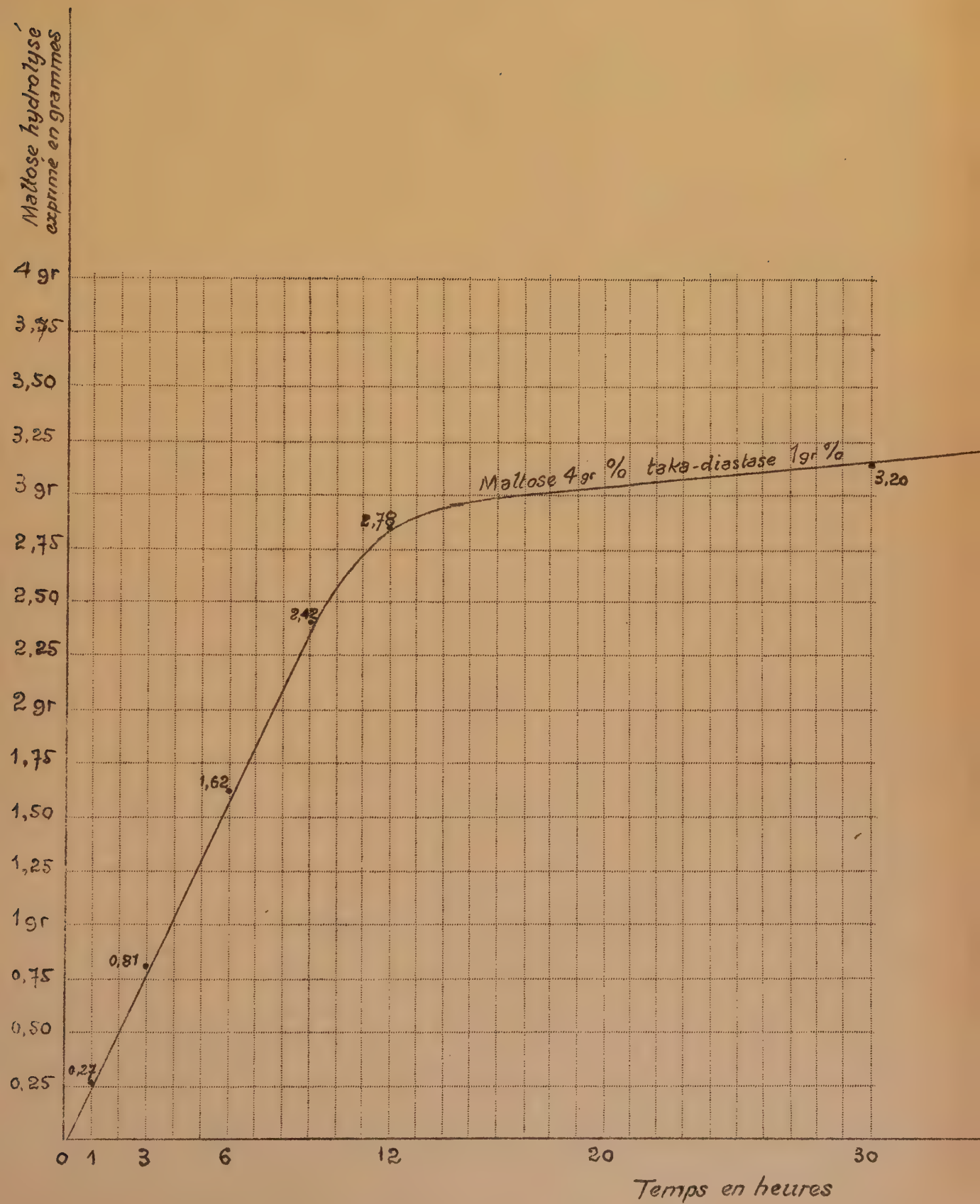
Conditions Expérimentales Maltose 6 gr, % = Taka-diaстase 1 gr % 0 = 39°		
Temps en heures	x = qté de maltose hydrolysé (en gr.pour 100 cm ³ de solution)	x (t+1) - x _t
0	0	
1	0 gr, 27	0,27
2	0 gr, 55	0,28
3	0 gr, 81	0,26
4	1 gr, 09	0,27
5	1 gr, 35	0,26
6	1 gr, 62	0,27
7	1 gr, 88	0,26
8	2 gr, 16	0,28
9	2 gr, 42	0,26
10	2 gr, 70	0,28
11	2 gr, 96	0,26
12	3 gr, 23	0,27
13	3 gr, 50	0,27
14	3 gr, 78	0,28
15	4 gr, 05	0,27
16	4 gr, 33	0,28
17	4 gr, 56	0,23
18	4 gr, 76	0,20
54	5 gr, 36	



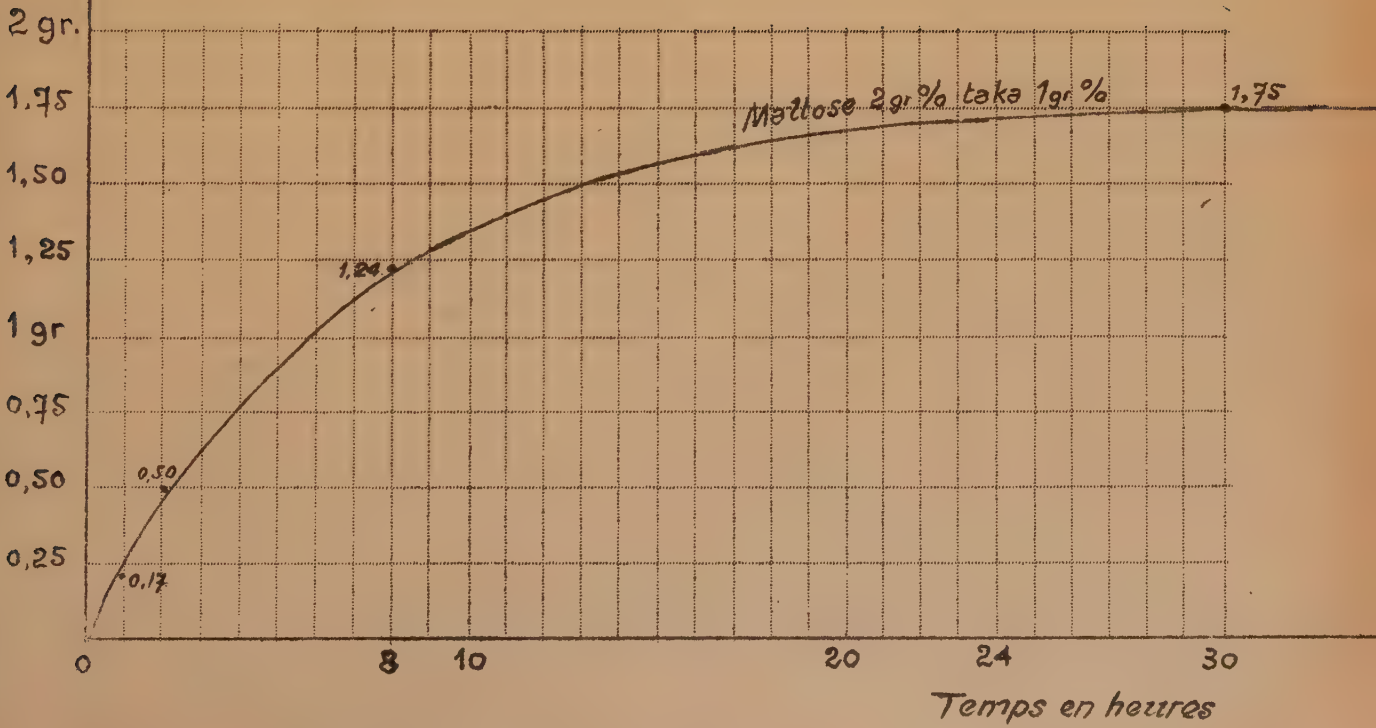
1ère série d'expériences

T A B L E A U II

Conditions expérimentales = Maltose 4 gr. % Taka-diaстase 1 gr. % O = 39°		
Temps en heures	x = qté de maltose hydrolysé (en gr. pour 100 cm ³)	$x_{(t+1)} - x_t$
0	0	
1	0 gr, 26	0, 26
2	0 gr, 54	0, 28
3	0 gr, 81	0, 27
4	1 gr, 08	0, 27
5	1 gr, 34	0, 26
6	1 gr, 62	0, 28
7	1 gr, 90	0, 28
8	2 gr, 16	0, 26
9	2 gr, 42	0, 26
10	2 gr, 62	0, 20
76		



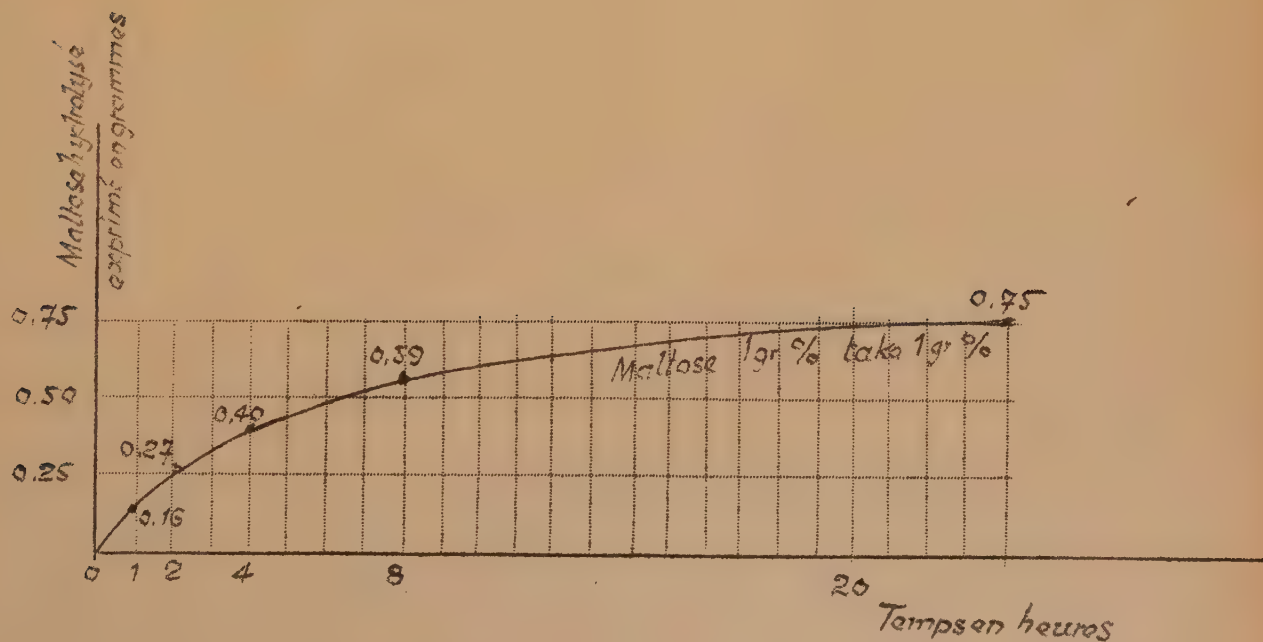
Maltose hydrolysé en grammes



1ère série d'expériences

T A B L E A U IV

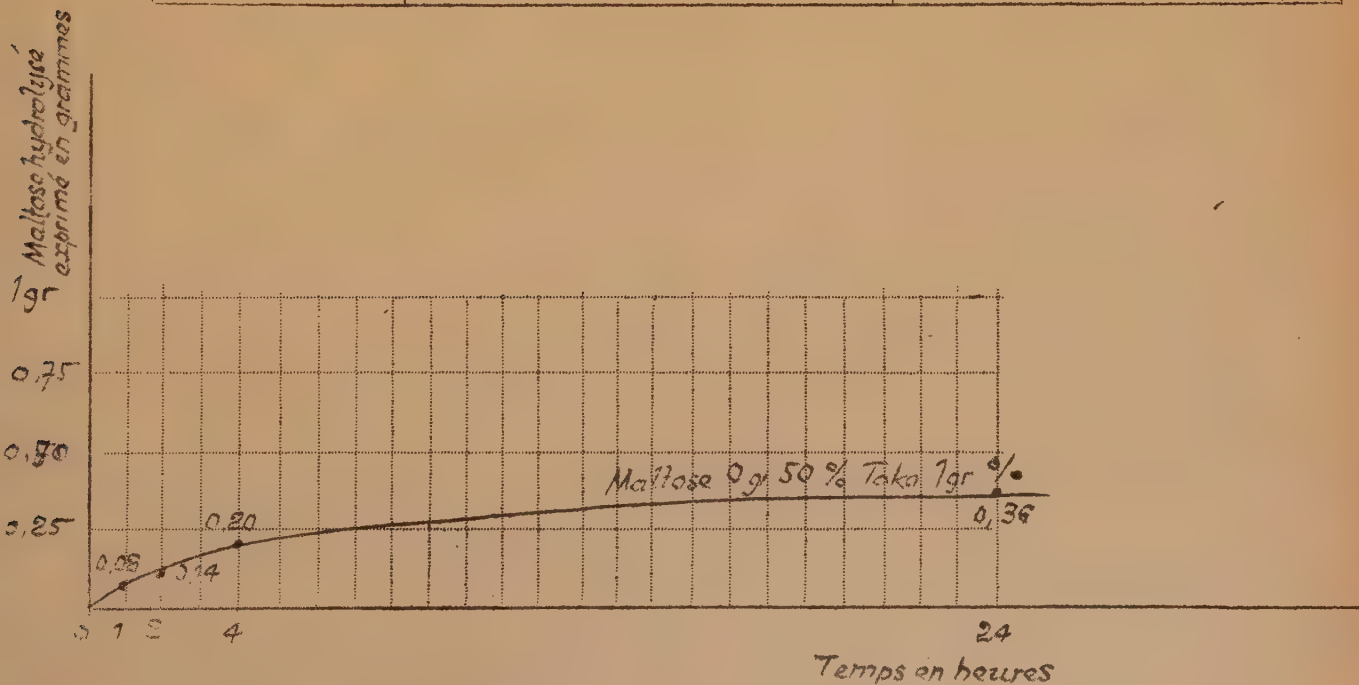
Conditions expérimentales = Maltose 1 gr. % Taka-diastrase 1 gr. % O = 39°		
Temps en heures	x = qté de maltose hydrolysé	$x(t + 1) - x_t$
0	0	
1	0 gr, 16	0 gr, 16
2	0 gr, 27	0 gr, 11
4	0 gr, 40	Ogr,13:2 = Ogr,06
52	0 gr, 99	



Ière série d'expériences

T A B L E A U V

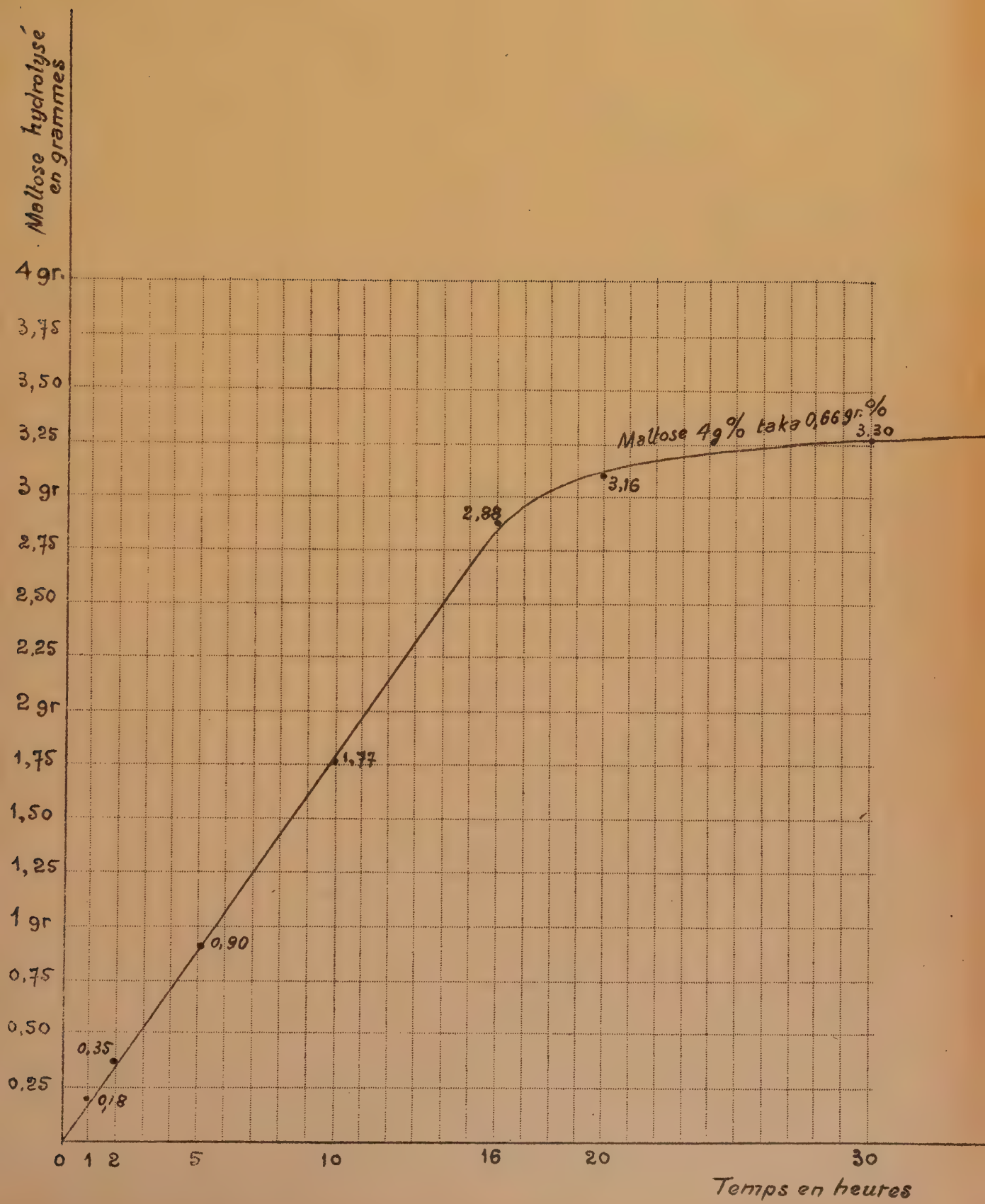
Conditions expérimentales = Maltose 0 gr, 50 % Taka-diaстase 1 gr % 0 = 39°		
Temps en heures	x = qté de maltose hydrolysé (en gr. pour 100 cm ³)	$x_{(t+1)} - x_t$
0	0	
1	0 gr, 08	0 gr, 08
2	0 gr, 14	0 gr, 06
4	0 gr, 20	0 gr, 06 : 2 = 0 gr, 03
24	0 gr, 36	



DEUXIEME SERIE D'EXPERIENCES : Dose d'enzyme 0 gr, 66 %

T A B L E A U VI

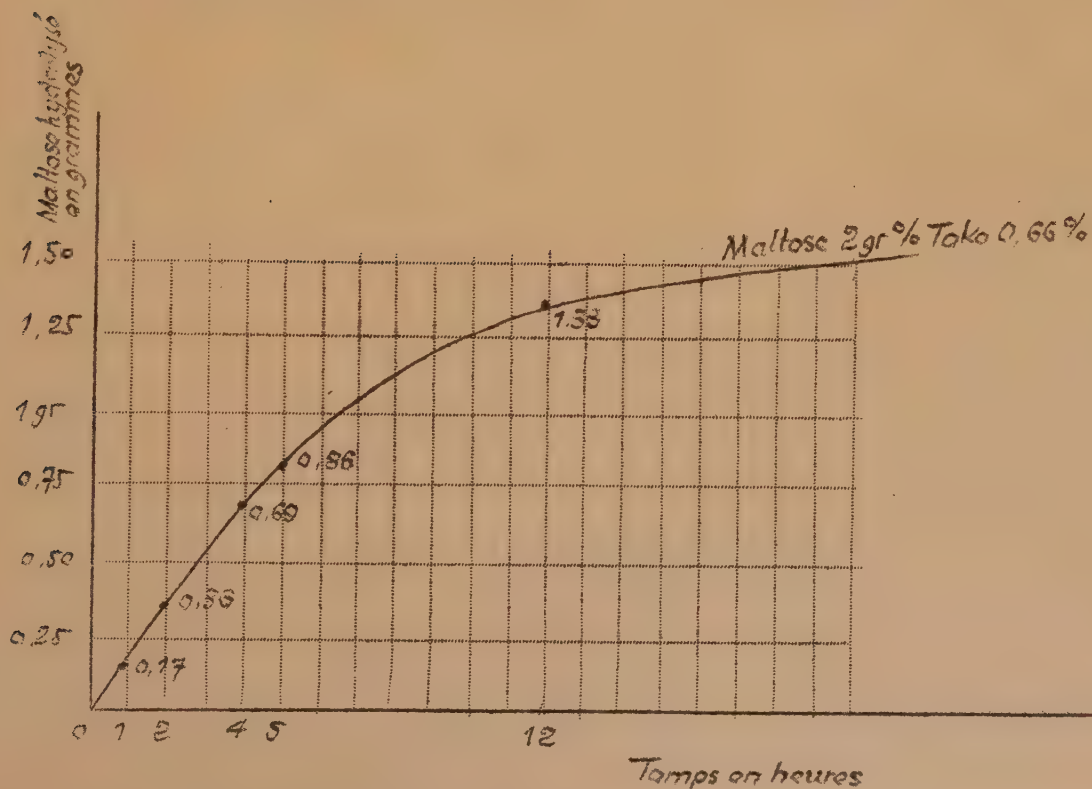
Conditions expérimentales = Maltose 4 gr. % Taka-diastase 0 gr, 66 % 0 = 39°		
Temps en heures	x = qté de maltose hydrolysé	$x(t + 1) - x_t$
0	0	
1	0 gr, 18	0 gr, 18
2	0 gr, 35	0 gr, 17
3	0 gr, 53	0 gr, 18
4	0 gr, 71	0 gr, 18
5	0 gr, 90	0 gr, 19
6	1 gr, 07	0 gr, 17
7	1 gr, 25	0 gr, 18
8	1 gr, 44	0 gr, 19
9	1 gr, 60	0 gr, 16
10	1 gr, 77	0 gr, 17
11	1 gr, 95	0 gr, 18
12	2 gr, 14	0 gr, 19
13	2 gr, 33	0 gr, 19
14	2 gr, 53	0 gr, 18
15	2 gr, 69	0 gr, 18
16	2 gr, 88	0 gr, 19
17	3 gr, 01	0 gr, 13



2ème série d'expériences

T A B L E A U VII

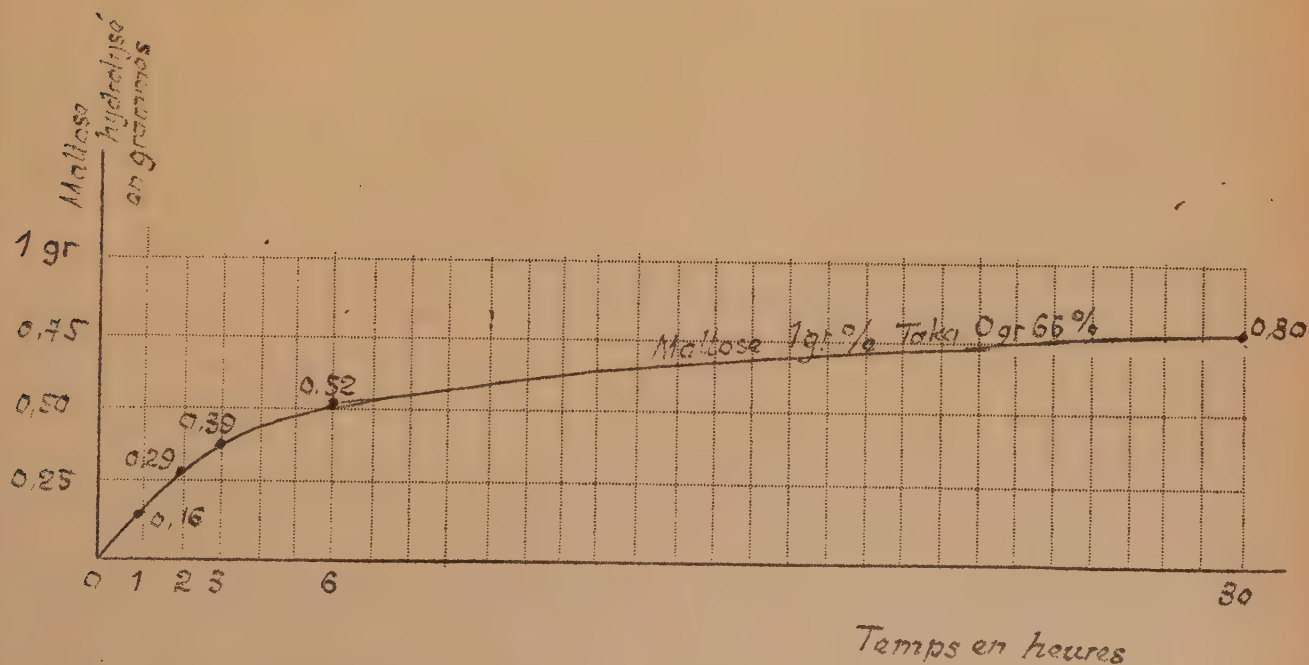
Conditions expérimentales = Maltose 2 % Taka-diastrase = 0,66 gr. % 0 = 39°		
Temps en heures	x = qté de maltose hydrolysé	$x(t + 1) - x_t$
0	0	0 gr, 17
1	0 gr, 17	0 gr, 19
2	0 gr, 36	0 gr, 16
3	0 gr, 52	0 gr, 17
4	0 gr, 69	0 gr, 17
5	0 gr, 86	0 gr, 12



2ème série d'expériences

T A B L E A U VIII

Conditions expérimentales = Maltose 1 gr. % = Taka-diastrase 0,66 gr. % O = 39°		
Temps en heures	x = qté de maltose hydrolysé	$x(t + 1) - x_t$
0		
1	0 gr, 16	0 gr, 16
2	0 gr, 29	0 gr, 13
3	0 gr, 39	0 gr, 10
6	0 gr, 52	0 gr, 13 : 3
30	0 gr, 80	



TROISIEME SERIE D'EXPERIENCES = Dose d'enzyme Ogr, 5 %

T A B L E A U IX

Conditions expérimentales = Maltose 4 gr, % = Taka-diaastase Ogr, 5 % 0 = 39°		
Temps en heures	x = qté de maltose hydrolysé	$x(t + 1) - x_t$
0		
1	0 gr, 14	0 gr, 14
2	0 gr, 29	0 gr, 15
3	0 gr, 42	0 gr, 13
4	0 gr, 56	0 gr, 14
5	0 gr, 69	0 gr, 13
6	0 gr, 84	0 gr, 15
7	0 gr, 97	0 gr, 13
8	1 gr, 12	0 gr, 15
9	1 gr, 24	0 gr, 12
10	1 gr, 39	0 gr, 15
12	1 gr, 66	0 gr, 27 : 2 = 0 gr, 13
14	1 gr, 90	0 gr, 24 : 2 = 0 gr, 12
16	2 gr, 16	0 gr, 26 : 2 = 0 gr, 13
18	2 gr, 44	0 gr, 28 : 2 = 0 gr, 14
20	2 gr, 70	0 gr, 26 : 2 = 0 gr, 13
22	2 gr, 96	0 gr, 26 : 2 = 0 gr, 13
24	3 gr, 22	0 gr, 26 : 2 = 0 gr, 13
26	3 gr, 40	0 gr, 18 : 2 = 0 gr, 09
40	3 gr, 62	

moles hydrolyse en grammes

gr.

75

50

25

gr

0

5

gr.

5

0

5

gr.

5

0

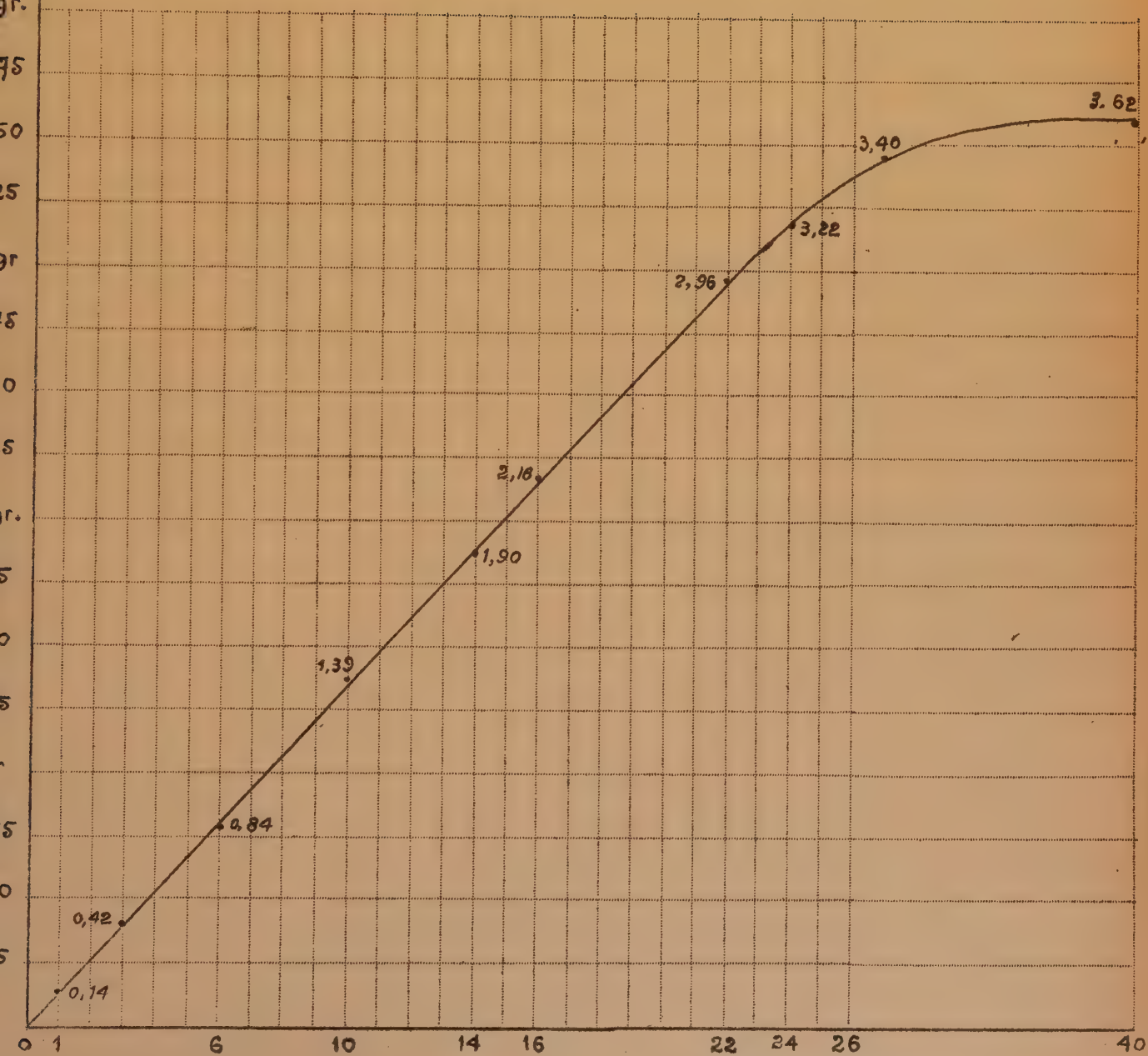
5

gr.

5

0

5



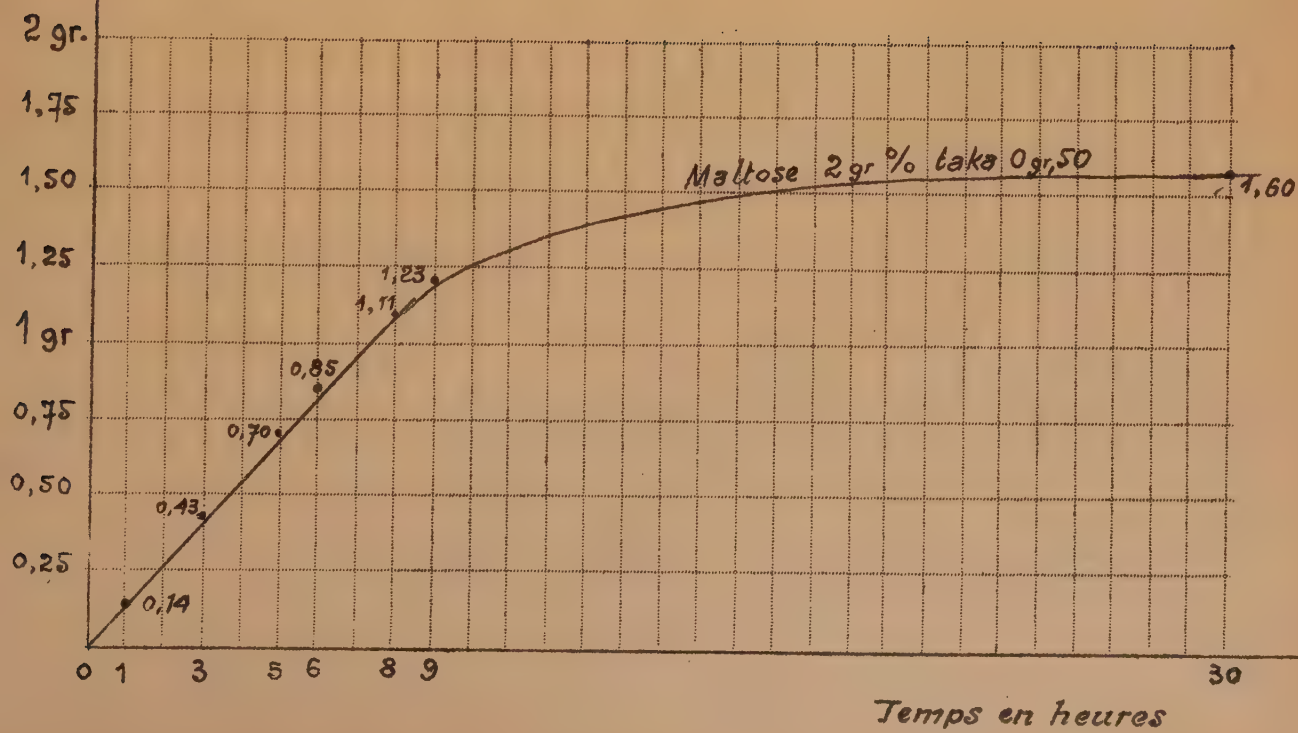
Temps en heures

3ème série d'expériences

T A B L E A U X

Maltose : 2 gr % Conditions expérimentales = Taka-diastrase = 0gr, 50 % 0 = 39°		
Temps en heures	x = qté de maltose hydrolysé	$x(t + 1) - x_t$
0	0	
1	0 gr, 14	0 gr, 14
2	0 gr, 27	0 gr, 13
3	0 gr, 43	0 gr, 16
4	0 gr, 57	0 gr, 14
5	0 gr, 70	0 gr, 13
6	0 gr, 85	0 gr, 15
7	0 gr, 97	0 gr, 12
8	1 gr, 11	0 gr, 14
9	1 gr, 23	0 gr, 12
10	1 gr, 32	0 gr, 09
48	1 gr, 80	

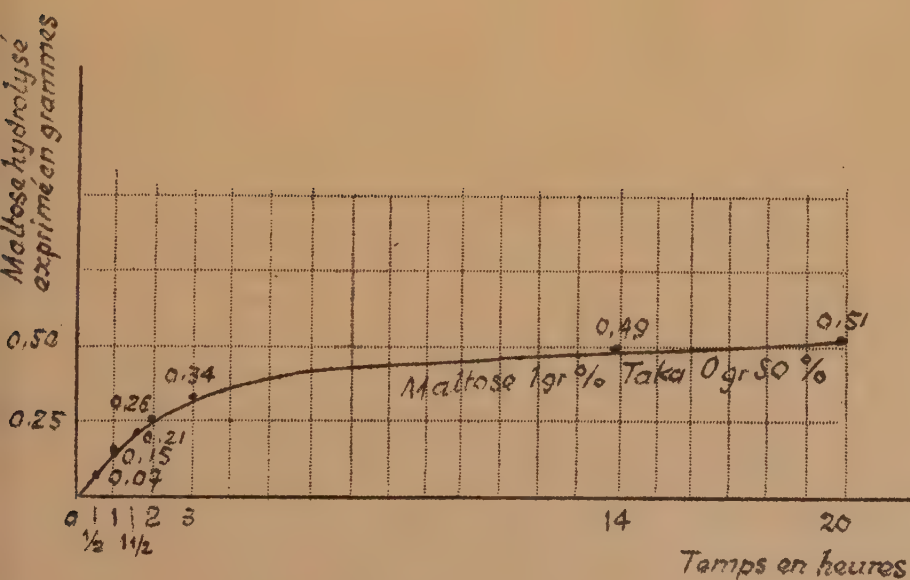
Maltose hydrolysé en grammes.



3ème série d'expériences

T A B L E A U X I

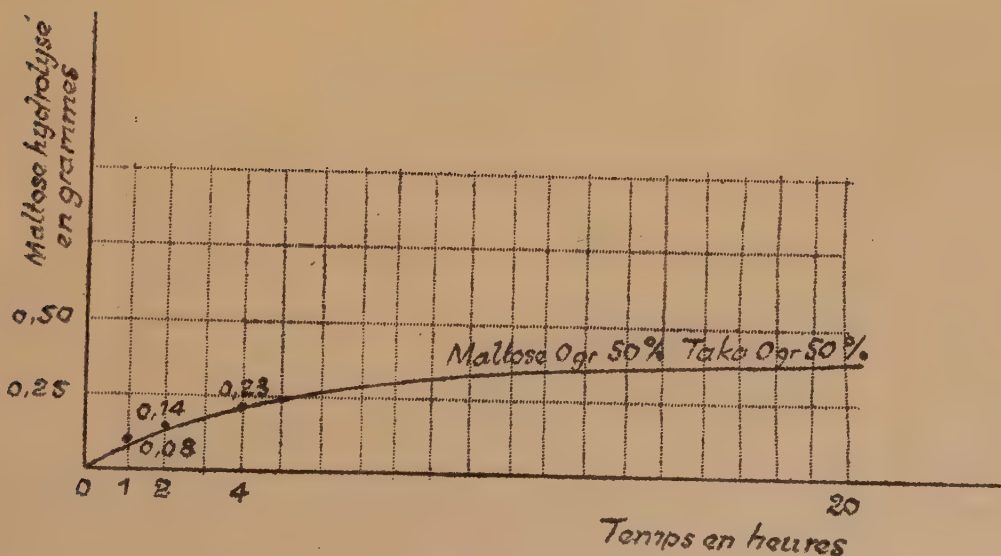
Conditions expérimentales = Maltose 1 gr. % Taka-diastrase = 0 gr, 5 % 0 = 39°		
Temps en heures	x = qté de maltose hydrolysé	$x(t + 1/2) - x_t$
0	0 gr.	
1/2	0 gr, 07	0 gr, 07
1	0 gr, 15	0 gr, 08
1 1/2	0 gr, 21	0 gr, 07
2	0 gr, 26	0 gr, 05
3	0 gr, 34	0 gr. 08:2 = 0 gr, 04
20	0 gr, 51	



3ème série d'expériences

T A B L E A U X I I

Conditions expérimentales = Maltose 0 gr, 5 % Taka-diaстase = 0 gr, 5 % O = 39°		
Temps en heures	x = qté de maltose hydrolysé	$x(t + 1) - x_t$
0	0	
1	0 gr, 08	0 gr, 08
2	0 gr, 14	0 gr, 06
4	0 gr, 23	0 gr, 09 : 3 = 0 gr, 03
20	0 gr, 40	



I²/ L'étude des résultats et des courbes représentatives des hydrolyses faites dans les trois séries d'expériences nous a permis :

- 1²) de déterminer la durée de la phase d'ordre 0 dans les réactions où elle existe.
- 2²) de connaître la quantité approximative $S_0 - x$ de maltose non hydrolysé restant en solution au moment où la cinétique de la réaction change d'ordre.
- 3²) de vérifier que pour les réactions présentant une cinétique d'ordre 0 les quantités de maltose non hydrolysé restant en solution à la fin de cette période sont proportionnelles à la concentration enzymatique et indépendantes de la teneur initiale en substrat.

Les tableaux suivants montrent pour chaque série d'expériences la durée de la phase ou de la zone d'ordre 0 et les limites entre lesquelles est comprise la quantité de maltose non hydrolysé restant en solution quand la courbe change d'allure.

DUREE DE LA PHASE D'ORDRE 0

So	6gr. %	4 gr. %	2gr. %	1gr. %	0gr.5 %
E = 1gr%	16 h.	9 h.	1h.1/2	0 h.	0 h.
E = 0gr66%		16 h.	0 h.	0 h.	0 h.
E = 0gr50%		26 h.	9h.1/2	1h.1/2	0 h.

So = concentration initiale en maltose

E = concentration enzymatique

Quantité So - x restant en solution quand la réaction change d'ordre

E	Concentration enzymatique E = 1 gr. %		
So	6 gr %	4 gr %	2 gr %
So-x	$1g41 < So-x < 1g67$	$1g38 < So-x < 1g67$	$1g50 < So-x < 1g60$
So-x est sensiblement égal à lgr. 56			

Concentration enzymatique E = 0gr.66 %			
So		4 gr %	2 gr %
So-x		$0g99 < So-x < 1g12$	$1g02 < So-x < 1g14$
So-x est sensiblement égal à lgr. 06			

Concentration enzymatique E = 0gr.50 %			
So	4 gr %	2 gr %	1 gr %
So-x	$0g60 < So-x < 0g78$	$0g70 < So-x < 0g77$	$0g74 < So-x < 0g79$
So-x est sensiblement égal à 0gr.73			

Ainsi les quantités de maltose so-x restant en solution quand la réaction change d'ordre sont bien proportionnelles à la concentration enzymatique et indépendantes de la teneur initiale en substrat, comme le prouve l'égalité des rapports suivants :

$$\frac{E}{So-x} \neq \frac{1}{1,56} \neq \frac{0,66}{1,06} \neq \frac{0,50}{0,73}$$

CONCLUSIONS RELATIVES AUX RESULTATS OBTENUS
DANS L'HYDROLYSE ETUDIEE EN FONCTION DU TEMPS

En considérant strictement la marche de l'hydrolyse au cours du temps, la comparaison des trois séries d'expériences dans lesquelles la concentration enzymatique E est constante, la seule variable étant la concentration initiale du substrat nous conduit aux conclusions suivantes :

Pour les réactions présentant une zone d'ordre 0 les concentrations du maltose restant en solution quand la réaction passe d'une cinétique d'ordre 0 à une cinétique d'ordre différent sont aux erreurs d'expériences près :

- 1^{re}) indépendantes de la concentration initiale en maltose,
- 2^{de}) proportionnelles à la concentration enzymatique.

On peut interpréter ainsi ces résultats : La concentration du substrat so-x restant en solution est celle à laquelle on obtient la vitesse maximum de la catalyse enzymatique et peut être considérée comme une constante caractéristique de l'enzyme.

Il est évident qu'une quantité E d'enzyme ne peut

fixer au maximum qu'une quantité S_1 de substrat, or tant que l'enzyme est saturé ou plus exactement tant que les centres actifs de l'enzyme sont occupés par le substrat, la concentration du complexe enzyme substrat demeure constante et la vitesse observée $v = k_3 (ES_1)$, mais à mesure que la réaction progresse, la concentration du substrat diminue, $S < S_1$, et la concentration du complexe (ES) diminue également, de sorte que la vitesse de la réaction décroît puisqu'elle est proportionnelle à la concentration du complexe (ES). La concentration du complexe ne peut être mesurée directement, mais cependant nous voyons dans le cas des expériences précédentes qu'au-dessus de la concentration particulière S_1 ; un excès de substrat ne produit aucun accroissement de vitesse, donc aucun accroissement de concentration du complexe (ES_1), l'enzyme libre est alors $= E - (ES_1) = 0$ et la vitesse maximum $\sqrt{m}$ est donc égale à

$$\sqrt{m} = k_3 (ES_1) = k_3 E$$

En cherchant expérimentalement pour la taka-diaxase utilisée, la concentration S_1 qui donne la vitesse maximum dans le cas d'une teneur enzymatique de 1gr. % et que nous appellerons la concentration critique, il nous a été possible de déterminer les zones de comportement de la réaction grâce au rapport $\frac{1}{S_1}$:

Si $\frac{1}{S_1} < \frac{E}{S_0}$ { la réaction comporte une zone d'ordre 0

Si $\frac{1}{S_1} > \frac{E}{S_0}$ { la réaction ne comporte pas de zone d'ordre 0.

Nous avons pensé qu'il n'était pas sans intérêt de suivre régulièrement au cours du temps une hydrolyse dans laquelle nous avons opposé à 1gr % de Taka-diaстase,

1^o) une concentration de 1gr.50 % de maltose, c'est-à-dire, une concentration sensiblement égale à la concentration critique S_1 déterminée par l'ensemble de nos expériences précédentes.

2^o) une concentration de 0gr.80 %, c'est-à-dire, une concentration sensiblement égale à la moitié de la concentration critique S_1

Voici les résultats obtenus :

Conditions expérimentales	Taka-diastase 1gr. % Maltose 1gr. 50 % 0 = 32°	Taka-diastase 1gr % Maltose : 0gr.80 % 0 = 32°
Temps en heures	X	X
0	0 ₀	
1	0, 22	0, 12
2	0, 39	0, 22
3	0, 56	0, 30
4	0, 71	0, 38
5	0, 81	0, 45
6	0, 92	0, 50
7	1, 01	0, 54
8	1, 08	0, 57
9	1, 13	0, 61
10	1, 19	0, 64
11	1, 22	0, 67
12	1, 27	0, 69

Les résultats expérimentaux trouvés confirment bien nos prévisions, les deux réactions évoluent dès le début dans une zone dont la cinétique n'est pas d'ordre 0.

ETUDE DE LA CINETIQUE DE LA REACTION

Si nous désignons par (E), la concentration enzymatique, par (S) celle du substrat par (ES) la concentration du complexe enzyme-substrat et par K_m la constante de Michaelis égale à la concentration du substrat pour laquelle la vitesse est égale à la moitié de la vitesse maximum, nous avons :

$$(ES) = \frac{(E)(S)}{S + K_m}$$

relation bien connue, qu'on obtient en résolvant par rapport à (ES) l'équation :

$$\frac{\{ (E) - (ES) \}}{(ES)} \frac{\{ (S) - (ES) \}}{(ES)} = K_m$$

dans laquelle on a négligé (ES) devant (S).

D'autre part, la vitesse d'hydrolyse étant à tout instant proportionnelle à (ES), on a

$$v = k (ES) = \frac{k (E)(S)}{(S) + K_m} \quad (1)$$

- 3 cas peuvent alors se présenter :

1°) Si (S) est grand par rapport à K_m , on peut au dénominateur négliger K_m devant (S) l'équation (1) prend la forme :

$$v = \frac{k (E)(S)}{(S)} = k (E)$$

v est donc constant et la réaction est d'ordre 0.

2°) Si (S) et (K_m) sont du même ordre de grandeur,

l'équation (1) subsiste telle quelle,

en posant $v = -\frac{d(S)}{dt}$: on a

$$\frac{-d(S)}{dt} = \frac{k(E)(S)}{(S) + K_m}$$

équation différentielle du 1er ordre, qu'on intègre facilement puisque les variables se séparent, on peut écrire :

$$\frac{\{ (S) + (K_m) \}}{(S)} d(S) = k(E) dt$$

$$-d(S) - K_m \frac{d(S)}{(S)} = k(E) dt$$

$$d'où -S - K_m \log(S) = k(E)t + C^{te}$$

La constante d'intégration s'obtient en écrivant que pour $t = 0$, on $(S) = (S_0)$

$$\text{ce qui donne } -(S_0) - K_m \log(S_0) = 0 + C^{te}$$

$$d'où finalement - (S) - K_m \log(S) = k(E)t - (S_0) - K_m \log(S_0)$$

$$\text{où } (S_0) - (S) + K_m \log\left(\frac{S_0}{S}\right) = k(E)t$$

$$\text{où } (S_0) + K_m \log(S_0) = (S) + K_m \log(S) + k(E)t$$

Donc en définitive tant que (S) est du même ordre de grandeur que K_m ,

la quantité $S + K_m \log(S) + k(E)t$ doit garder une valeur constante égale.

$$\text{à } (S_0) + K_m \log(S_0)$$

3^e) Si (S) est petit par rapport à K_m , on peut dans la formule générale (1) négliger (S) devant K_m et l'on a :

$$v = \frac{k(E)(S)}{K_m}$$

En remplaçant v par $\frac{d(S)}{dt}$, on a :

$$- \frac{d(S)}{dt} = \frac{k(E)(S)}{K_m}$$

$$- \frac{d(S)}{(S)} = \frac{k(E)}{K_m} dt$$

$$- \text{Log}(S) = \frac{k(E)}{K_m} t + C^{te}$$

$$\text{d'où } C^{te} = -\text{Log}(S_0)$$

$$\text{et } \text{Log} \frac{(S_0)}{(S)} = \frac{k(E)t}{K_m} \text{ et } \boxed{k(E) = \frac{1}{t} K_m \log \frac{S_0}{S} = C^{te}}$$

- La réaction a une cinétique d'ordre 1.

En résumé si l'on oppose à un substrat donné, une quantité déterminée E d'un enzyme donné caractérisé relativement à ce substrat par sa constante de Michaelis K_m , trois cas peuvent se présenter :

a) si l'on part d'une concentration initiale en substrat S_0 , très petite par rapport à K_m , dès le début de l'hydrolyse, c'est la réaction étudiée au 3ème cas qui se produit.

La réaction comporte donc une zone unique et la cinétique est du 1er ordre pendant tout le cours de l'hydrolyse.

b) si la concentration initiale du substrat S_0 est du même ordre de grandeur que K_m , la réaction s'effectue tout d'abord suivant la loi étudiée au 2ème cas et on doit pouvoir vérifier l'invariabilité au cours du temps de l'expression :

$$(S) + K_m \log (S) + k (E) t$$

S diminuant tout au long de la réaction devient petit par rapport à K_{m1} alors la réaction passera à une cinétique d'ordre 1, et on pourra vérifier la constance de l'expression :

$$(S_0) + K_m \log (S_0)$$

La réaction présentera deux zones distinctes.

c) Si la concentration initiale du substrat S_0 est grande par rapport à K_{m1} la réaction est d'abord d'ordre 0, puis à mesure que l'hydrolyse s'effectue S devient du même ordre de grandeur que K_m , alors la réaction suit la loi étudiée au 2ème cas, puis au cours du temps S devient plus petit que K_m et la réaction présente une cinétique d'ordre 1.

Les résultats expérimentaux que nous avons trouvés nous ont permis :

1º) de constater que dans le cas d'une concentration de 6 gr % en maltose, qui correspond à une concentration moléculaire de 0,1754; concentration nettement supérieure à la constante de Michaelis, dont la valeur pour la taka-diaxase Parke et Davis utilisée est relativement au maltose de 0,0269, nous avons bien dès le début et d'ailleurs pendant un temps assez long, une réaction dont la cinétique est d'ordre 0.

2º) de constater dans le cas où la concentration moléculaire du maltose est sensiblement égale au double de K_m et à K_m lui-même, la réaction évolue dès le début suivant une ciné-

tique d'ordre 1, aux erreurs d'expérience près. Cette conclusion découle immédiatement des deux tableaux ci-dessous dans lesquels nous faisons figurer en regard des valeurs expérimentales de x , les valeurs calculées à l'aide de la formule $x = a(1 - e^{-kt})$, e^{-k} étant déterminée à partir de la valeur expérimentale de x pour $t = 1$.

Conditions expérimentales Maltose 1 gr. 50 % Taka-diaстase 1 gr. % $\theta = 32^{\circ}$ = (Concentration Moléculaire $0^{M.0438}$ $K_m = 0, 0269$		
Temps en heures	x (expérimental)	x (calculé)
0	0	0
1	0 gr, 22	0 gr, 22
2	0 gr, 39	0 gr, 3908
3	0 gr, 56	0 gr, 5691
4	0 gr, 71	0 gr, 7059
5	0 gr, 81	0 gr, 8226
6	0 gr, 92	0 gr, 9222
7	1 gr, 01	1 gr, 0071
8	1 gr, 08	1 gr, 0795
9	1 gr, 13	1 gr, 1413
10	1 gr, 19	1 gr, 1940
11	1 gr, 22	1 gr, 2390
12	1 gr, 27	1 gr, 2874

Conditions expérimentales { Maltose 0 gr, 80 % Taka-diastase 1 gr % $\theta=32^\circ$ {Concentration Moléculaire 0^M.0233 $K_m = 0, 0269$		
Temps en heures	x (expérimental)	x (calculé)
0	0	0
1	0 gr, 12	0 gr, 12
2	0 gr, 22	0 gr, 2225
3	0 gr, 30	0 gr, 3087
4	0 gr, 38	0 gr, 3824
5	0 gr, 45	0 gr, 4450
6	0 gr, 50	0 gr, 4982
7	0 gr, 54	0 gr, 5436
8	0 gr, 57	0 gr, 5820
9	0 gr, 61	0 gr, 6148
10	0 gr, 64	0 gr, 6424
11	0 gr, 67	0 gr, 6661
12	0 gr, 69	0 gr, 6862

II

INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN MALTOSE

Nous allons examiner les tableaux précédents, en vue de déterminer l'influence de la concentration en substrat sur la vitesse d'hydrolyse, la concentration en enzyme restant invariable.

1^o) Considérons les cinq expériences correspondant à la première série et dans lesquelles on oppose à 1 gr. % de diastase, successivement :

6 gr. %

4 gr. %

2 gr. %

1 gr. %

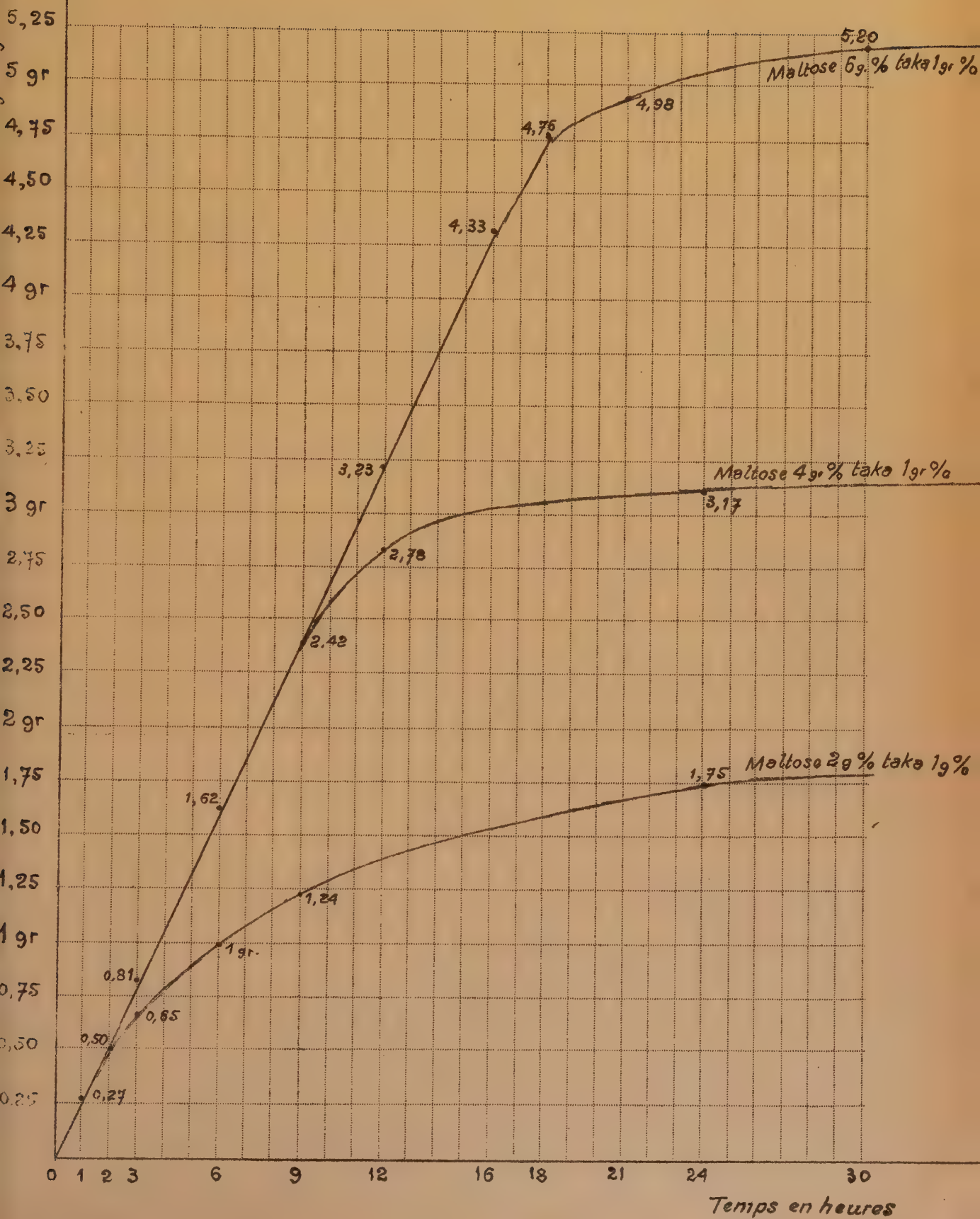
0 gr. 50 %

de maltose.

A/ Pour les trois premières expériences comportant toutes une phase d'ordre 0, nous constatons que pendant cette phase la grandeur de cette vitesse est indépendante de la concentration initiale du maltose; la durée de la réaction d'ordre 0 changeant seule d'une expérience à l'autre.

(Voir tableau suivant et courbes correspondantes).

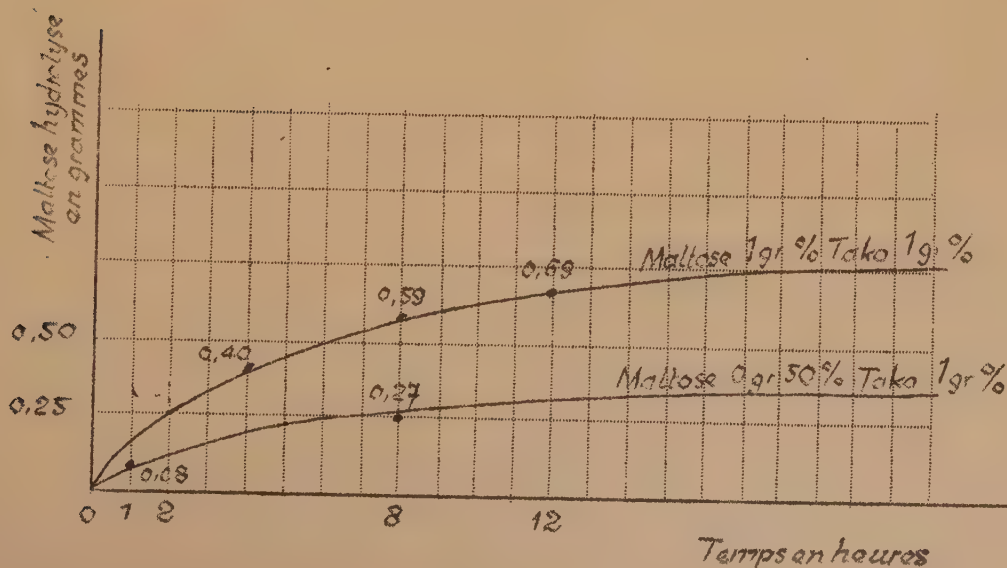
Concentration en enzyme 1 gr. %					
Concentration en maltose	6 gr		4 gr		2 gr
Durée de la phase d'ordre 0	16 h.		9 h.		1 h. 1/2
Vitesse pendant la phase d'ordre 0, exprimée en grammes de maltose hydrolysé pendant l'unité de temps.	temps en H.	maltose hydrolysé en gr.pdt. l'unité de temps	temps en H.	maltose hydrolysé en gr.pdt. l'unité de temps	temps en H. maltose hydrolysé en gr.pdt. l'unité de temps
	0		0		0
	1	0 gr,27	1	0 gr,26	1/2 0gr,13)
	2	0 gr,28	2	0 gr,28	1 0gr,14)
	3	0 gr,26	3	0 gr,27	1 1/2 0gr,13)
	4	0 gr,27	4	0 gr,27	2 0gr,10)
	5	0 gr,26	5	0 gr,26	
	6	0 gr,28	6	0 gr,28	
	7	0 gr,26	7	0 gr,28	
	8	0 gr,28	8	0 gr,26	
	9	0 gr,26	9	0 gr,26	
	10	0 gr,28	10	0 gr,20	
	11	0 gr,26			
	12	0 gr,27			
	13	0 gr,27			
	14	0 gr,28			
	15	0 gr,27			
	16	0 gr,28			
	17	0 gr,23			



B/ Pour les deux autres expériences (1 gr % et 0 gr,50 de maltose) dans lesquelles les réactions sont d'ordre 1, les vitesses initiales mesurées par les quantités de substrat hydrolysé, pendant la première heure de la réaction, sont respectivement : 0 gr,16 et 0 gr,08, elles sont donc proportionnelles à la teneur initiale en maltose.

Concentration en enzyme 1 gr. %		
Concentration en substrat	1 gr. %	0 gr.50 %
Durée de la phase d'ordre 0	0	0
Vitesse initiale exprimée en gr. de maltose	0 gr,16	0 gr,08

(voir courbes correspondantes).



2^e) Si nous considérons les deuxième et troisième séries d'expériences, relatives à une dose plus faible d'enzyme :

0 gr, 66 % et

0 gr, 50 %

nous arrivons aux mêmes conclusions, mais la limite de concentration en substrat au-dessous de laquelle la réaction cesse de présenter une phase d'ordre 0, si courte soit-elle, est fonction décroissante de la dose d'enzyme.

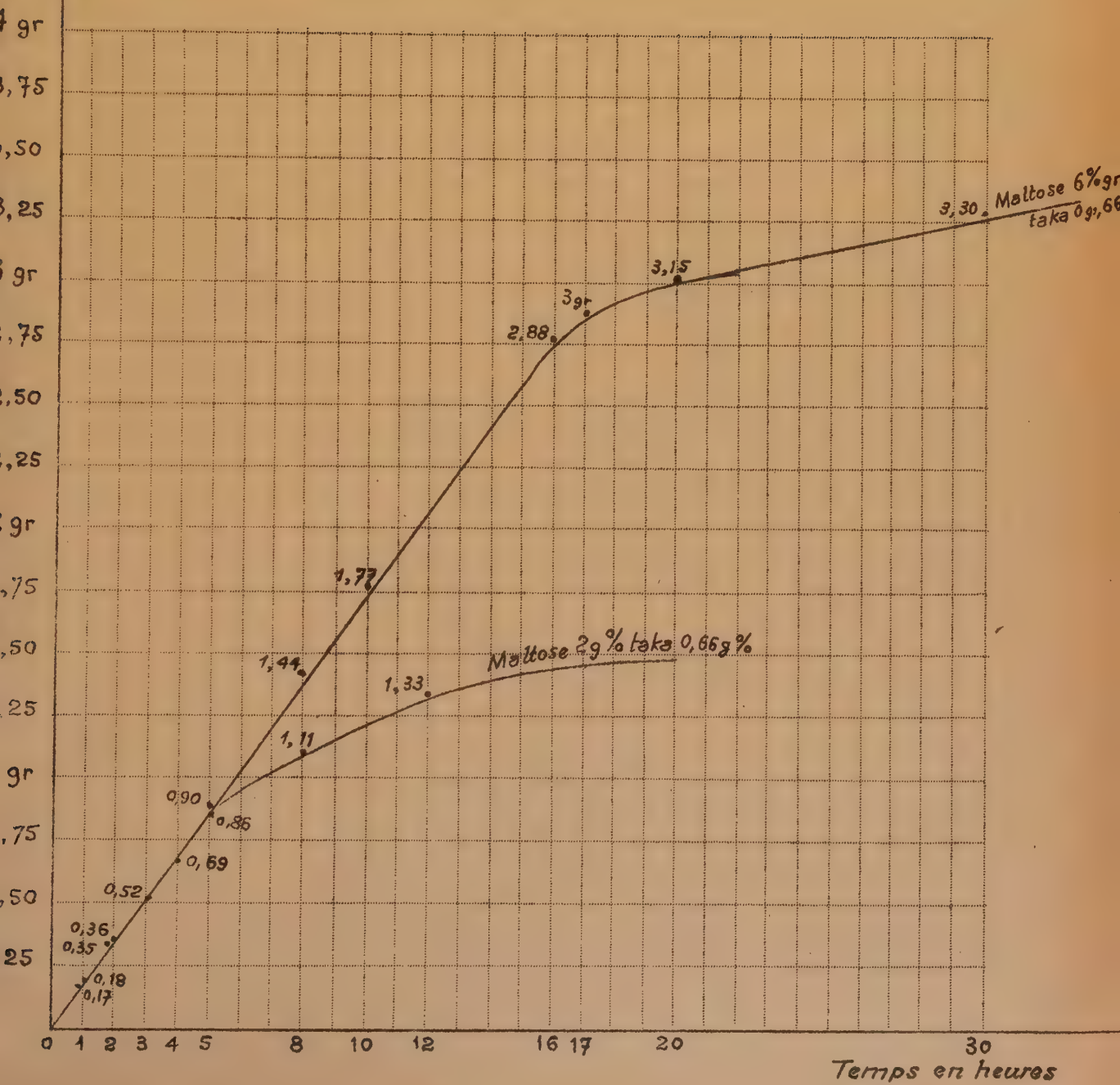
(voir les tableaux suivants et les courbes correspondantes).

N.B..- Il est intéressant de remarquer qu'en étudiant l'activité de certaines protéinases, en particulier de "*Clostridium histolyticum*" sur différents substrats synthétiques, Y. OGLE et Alfred TYTELL ont, dans un article publié en 1953 (35) trouvé des résultats semblables à ceux-ci.

Concentration en enzyme 0 gr, 66 %

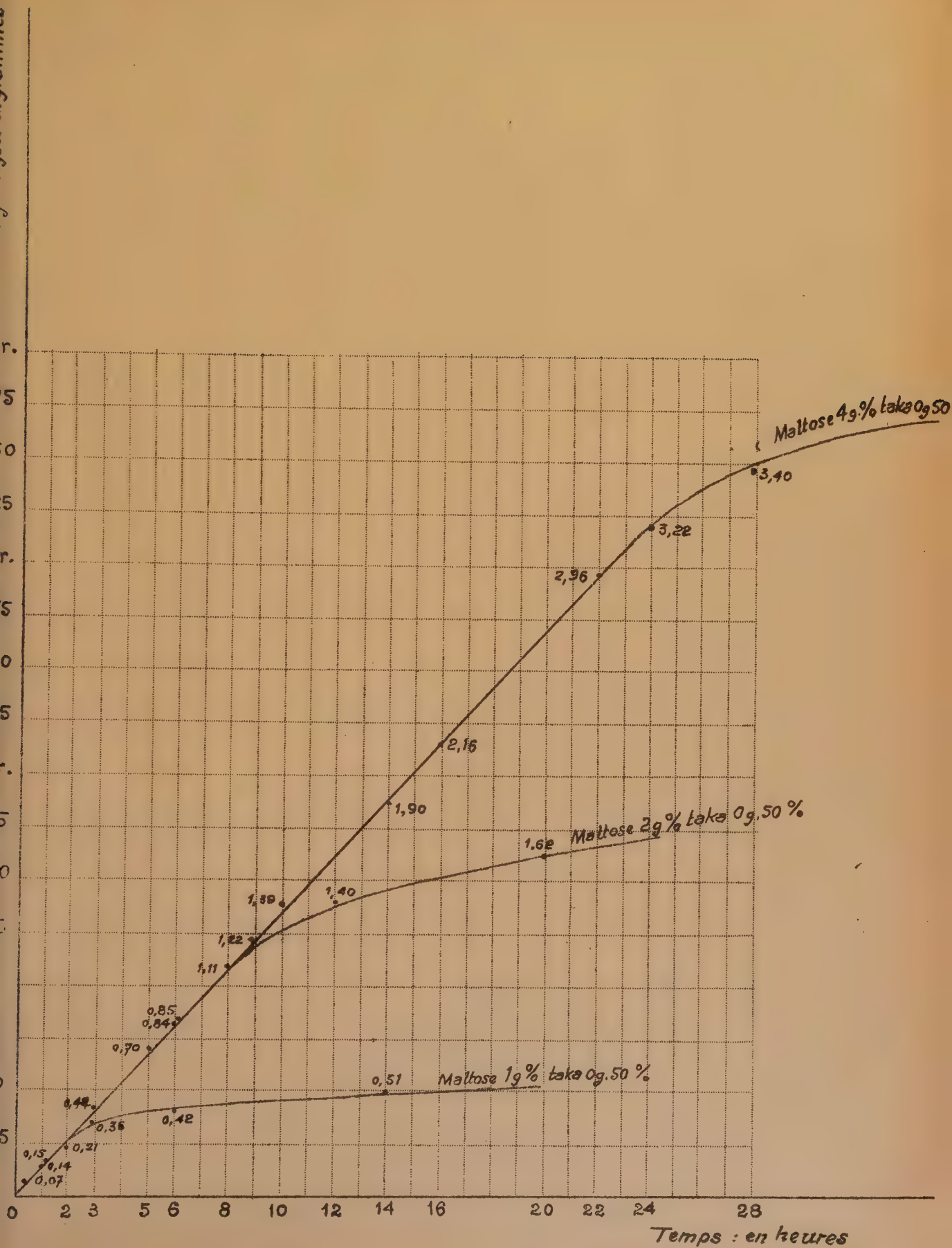
Concentration en maltose	4 gr, %		2 gr, %	
Durée de la phase d'ordre 0	16 h.		5 h.	
Vitesse pendant la phase d'ordre 0, exprimée en grammes de maltose hydrolysé pendant l'unité de temps.	temps en H.	Maltose hydrolysé en gr. pdt. l'unité de temps.	temps en H.	Maltose hydrolysé en gr. pdt. l'unité de temps.
	0		0	
	1	0 gr, 18	1	0 gr, 17
	2	0 gr, 17	2	0 gr, 19
	3	0 gr, 18	3	0 gr, 16
	4	0 gr, 19	4	0 gr, 17
	5	0 gr, 19	5	0 gr, 17
	6	0 gr, 17	6	0 gr, 12
	7	0 gr, 18		
	8	0 gr, 19		
	9	0 gr, 16		
	10	0 gr, 17		
	11	0 gr, 18		
	12	0 gr, 19		
	13	0 gr, 19		
	14	0 gr, 18		
	15	0 gr, 18		
	16	0 gr, 19		
	17	0 gr, 13		

Maltose hydrolysée en grammes.



Concentration en enzyme 0 gr, 50

Concentration en maltose	4 gr. %		2 gr. %		1 gr. %	
Durée de la phase d'ordre 0	24 h.		9 h.		1 h. 1/2	
Vitesse pendant la phase d'ordre 0, exprimée en gr. de maltose hydrolysé pendant l'unité de temps.	temps en h.	maltose hydrolysé en gr. pdt. l'unité de temps	temps en h.	maltose hydrolysé en gr. pdt. l'unité de temps	temps en h.	maltose hydrolysé en gr. pdt. l'unité de temps.
	0		0		0	
	1	0gr,14	1	0gr,14	1/2	0,07)
	2	0gr,15	2	0gr,13	1	0,08)
	3	0gr,13	3	0gr,16	1 1/2	0,07)
	4	0gr,14	4	0gr,14		
	5	0gr,13	5	0gr,13		
	6	0gr,15	6	0gr,15		
	7	0gr,13	7	0gr,12		
	8	0gr,15	8	0gr,14		
	9	0gr,12	9	0gr,12		
	10	0gr,15	10	0gr,07		
	12	0gr,27:2 0gr,13				
	14	0gr,24:2 0gr,12				
	16	0gr,26:2 0gr,13				
	18	0gr,28:2 0gr,14				
	20	0gr,26:2 0gr,13				
	22	0gr,26:2 0gr,13				
	24	0gr,26:2 0gr,13				
	28	0gr,18:4 0gr,04				
	40					



III

INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN ENZYME

Nous déterminerons l'influence de la dose d'enzyme sur la vitesse d'hydrolyse, en comparant entre elles, les expériences prises dans les séries, I, II, et III, relatives à une même dose de substrat.

Si nous prenons les expériences 2, 6 et 9, dans lesquelles la concentration en maltose est égale à 4 %, les concentrations respectives de la diastase étant de

1 gr %

0 gr, 66 %

0 gr, 50 %

Nous voyons que les vitesses correspondantes aux phases d'ordre 0 de ces expériences et mesurées par le poids de maltose hydrolysé dans l'unité de temps (1 heure) sont égales respectivement à,

0 gr, 27

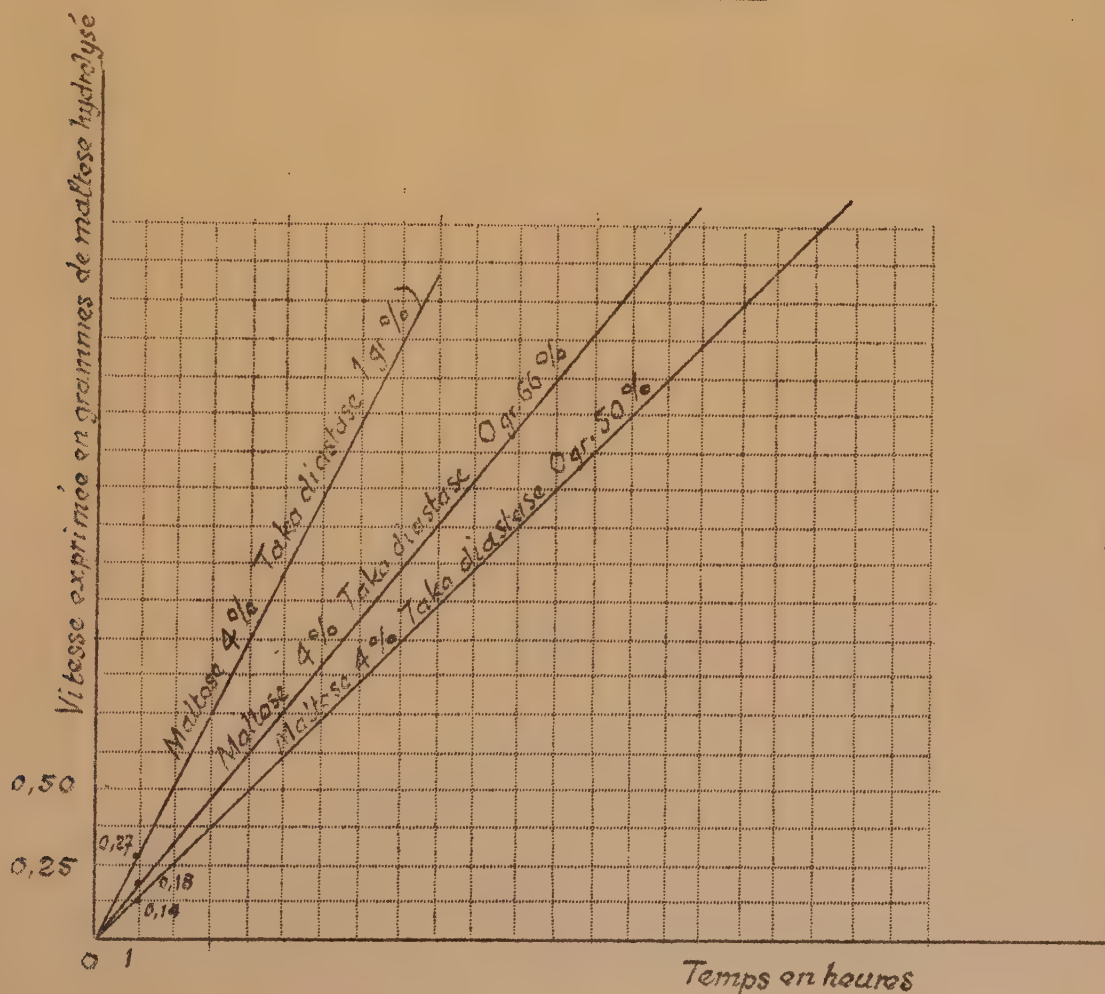
0 gr, 18

0 gr, 14

nombre très sensiblement proportionnels à la concentration en enzyme comme le montre le tableau suivant.

Concentration en substrat 4 %			
Concentration en enzyme	1 gr %	0gr,66 %	0gr,50 %
Vitesses mesurées en pds.de malto- se hydrolysé dans l'unité de temps pdt. la phase d'ordre 0	0 gr, 27	0 gr, 18	0 gr, 14
<u>Concent. enzymatique</u> vitesse	$\frac{1}{0,27} \quad \#$	$\frac{0,66}{0,18} \quad \#$	$\frac{0,50}{0,14}$

Droites représentatives



On obtient exactement les mêmes résultats numériques dans les expériences 3, 7 et 10, dans lesquelles :

la concentration en substrat est de 2 gr. %

la concentration en enzyme, de

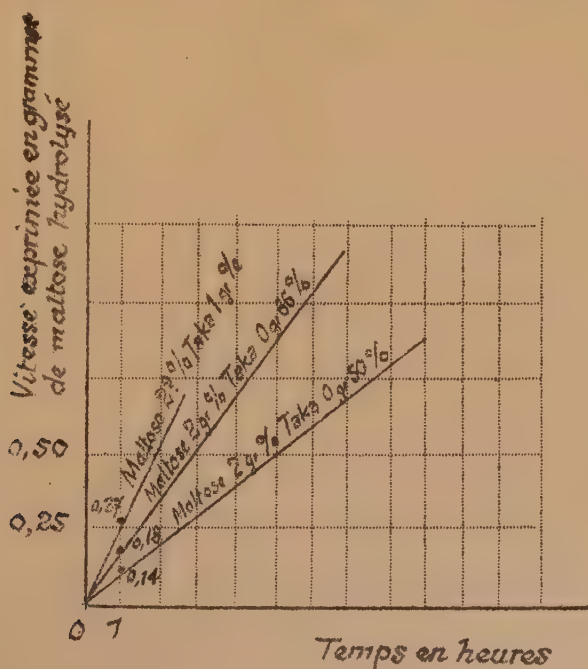
1 gr. %

0 gr, 66 %

0 gr, 50 %

Concentration en substrat 2 gr. %

Concentration en enzyme	1 gr.	0gr, 66	0gr, 50
Vitesse mesurée en pds de maltose hydrolysé dans l'unité de temps pdt. la phase d'ordre 0.	0 gr, 27	0 gr, 18	0 gr, 14
$\frac{\text{Concent. enzymatique}}{\text{vitesse}}$	$\frac{1}{0,27} \quad \#$	$\frac{0,66}{0,18} \quad \#$	$\frac{0,50}{0,14}$



Enfin, dans le cas d'une concentration en maltose (exp. 4 et 8) égale à 1 gr. %, les réactions présentant dès le début une cinétique d'ordre 1, la vitesse initiale est sensiblement indépendante de la dose d'enzyme, c'est ainsi que, dans chacune des deux solutions examinées, les quantités de maltose hydrolysé pendant la première heure sont égales respectivement à :

Ogr, 16 (maltase 1gr %) - Ogr, 16 (maltase Ogr,66 %

Concentration en maltose 1 gr. %		
concentration en enzyme	1 gr. %	0 gr. 66 %
vitesse initiale pdt. la première H. de la phase d'ordre 1	0 gr.16	0 gr. 16

Il en est de même lorsque la concentration en maltose égale 0 gr. 50 % (exp. 5, 12) comme le montre le tableau des résultats :

Concentration en maltose 0 gr. 50 %		
concentration en enzyme	1 gr. %	0 gr. 50 %
vitesse initiale pdt. la première H. de la phase d'ordre 0.	0 gr. 08	0 gr. 08

R E M A R Q U E

Dans les conditions expérimentales où nous avons opéré, nous avons toujours constaté, qu'aux erreurs d'expérience près, la vitesse d'hydrolyse de la phase d'ordre 0 est sensiblement proportionnelle à la concentration en ferment. Or, d'après les expériences faites par Isaiev "la vitesse d'hydrolyse ne serait proportionnelle à la concentration de l'enzyme que pour des valeurs assez faibles de celle-ci, augmenterait ensuite moins vite pour des doses plus fortes, et serait alors proportionnelle à la racine carrée de cette dose d'enzyme".

Nous avons alors réalisé une expérience avec des concentrations d'enzyme supérieures à celles que nous avons employées dans l'étude précédente : sur une solution de maltose à 4 %, nous avons fait agir la taka-diaстase à des doses croissantes :

1gr % - 2gr % - 3gr % - 4gr % - 6gr % - 8gr %, et nous avons déterminé le poids de maltose disparu après deux heures d'hydrolyse.

Les nombres trouvés sont donnés dans le tableau suivant :

Concentration en maltose 4 gr. %	
Concentration en enzyme	Pourcentage de maltose hydro- lysé en deux heures
1 gr %	0 gr, 54 %
2 gr %	0 gr, 94
3 gr %	1 gr, 25
4 gr %	1 gr, 38
6 gr %	1 gr, 20
8 gr %	1 gr, 10

Nous voyons que les quantités hydrolysées augmentent d'abord avec la dose d'enzyme, mais sans lui être proportionnelles et cette augmentation est de moins en moins rapide. De plus, lorsque la dose d'enzyme atteint et dépasse 6gr. %, on aperçoit une légère diminution de la vitesse d'hydrolyse.

Il s'agit vraisemblablement d'un phénomène secondaire car, il est en effet paradoxal que l'augmentation de la dose de ferment qui devrait en réalité avoir pour effet d'accroître la concentration du complexe intermédiaire et corrélativement la vitesse d'hydrolyse, se traduise en définitive pour des doses assez fortes d'enzyme, par une diminution de cette même vitesse. Or, nous avons pu constater au cours de nos différentes expériences que la taka-diaстase dont nous nous servions, avait en solution aqueuse une action sur la

lumière polarisée, qu'elle présentait le phénomène de la mutarotation et qu'elle avait un assez fort pouvoir réducteur.

Ces différents faits nous ont conduit à penser que la taka-diastrase que nous utilisions contenait un sucre et, la comparaison du pouvoir réducteur et du pouvoir rotatoire nous a fait songer au lactose. Cette hypothèse s'est trouvée pleinement confirmée, d'une part par la chromatographie, d'autre part par les réactions colorées. Nous avons jugé intéressant de déterminer la teneur en lactose de cette poudre fermentaire. Pour cela, nous avons fait une solution contenant 2 gr. 50 % de taka-diastrase et avons dosé la liqueur aussitôt après sa préparation, dosage effectué sur 1 cm³. La réduction évaluée en lactose a donné 18 mmg 434, soit 1, 843 gr %. Donc, 2 gr.50 de Taka-diastrase contiennent 1, 843 gr. de lactose, soit une proportion de 73,7 gr. %. Dans ces conditions, l'augmentation de la dose d'enzyme introduisait dans les solutions soumises à l'hydrolyse, une proportion importante de lactose, et, celui-ci se révèle nous l'avons vérifié qualitativement comme inhibant l'hydrolyse du maltose. C'est donc, vraisemblablement en partie, à cause de l'action inhibitrice du lactose présent dans les solutions de Taka-diastrase, que la vitesse d'hydrolyse observée peut devenir fonction décroissante de la dose d'enzyme lorsque celle-ci augmente dans d'assez fortes proportions.

IV

ACTION DES INHIBITEURS

A/ Glucose, produit de la réaction -

Le premier inhibiteur dont nous avons étudié l'action est le glucose, produit de l'hydrolyse du maltose. Nos résultats confirment ceux des différents auteurs et nous indiquons dans le tableau ci-dessous l'importance des retards observés pour des concentrations de glucose égales respectivement à

4 gr %

8 gr %

le maltose étant employé en solution à 4 gr % avec 1 gr % de Taka-diaстase.

(voir tableau ci-joint).

T A B L E A U X I I I

Temps en h.	Maltose 4 gr. % Glucose 0 % Taka-diastase 1gr %	Maltose 4 gr. % Glucose 4 gr. % Taka-diastase 1gr%	Maltose 4 gr.% Glucose 8 gr.% Taka-diastase 1 gr.%
1	0 gr, 26	0 gr, 19	0 gr, 14
2	0 gr, 54	0 gr, 37	0 gr, 27
3	0 gr, 81	0 gr, 57	0 gr, 39
4	1 gr, 08	0 gr, 75	0 gr, 53
5	1 gr, 34	0 gr, 94	0 gr, 66
6	1 gr, 62	1 gr, 15	0 gr, 79
7	1 gr, 90	1 gr, 35	0 gr, 93
8	2 gr, 16	1 gr, 58	1 gr, 06
9	2 gr, 42	1 gr, 77	1 gr, 28
10	2 gr, 52	1 gr, 96	1 gr, 42
12	2 gr, 80	2 gr, 15	1 gr, 69
13	2 gr, 83	2 gr, 39	1 gr, 83
18	3 gr, 02	2 gr, 80	2 gr, 41

On voit par les chiffres ci-dessus que le glucose inhibe de façon très nette l'hydrolyse du maltose, et le retard observé croît, toutes choses égales d'ailleurs avec la concentration du glucose, mais sans lui être proportionnel. D'autre part, il ne semble pas que l'addition de glucose aux liqueurs soumises à l'action du ferment, modifie de façon sensible la quantité de maltose non hydrolysé restant en solution quand la vitesse d'hydrolyse commence à décroître. Nous avons en effet trouvé pour les trois expériences précédentes que la réaction passe de l'ordre 0 à l'ordre 1 lorsque 2gr.40 environ de maltose ont été hydrolysés.

B/ Oses n'apparaissant pas comme produits de la réaction
D-fructose, D-galactose.

Une expérience préliminaire effectuée en comparant les poids de maltose hydrolysé par des quantités équivalentes d'enzyme, agissant sur des solutions de maltose pures ou additionnées de D-fructose ou de D-galactose nous a convaincus que, conformément aux affirmations d'un certain nombre d'auteurs, le fructose agit bien comme inhibiteur.

D'autre part, et contrairement aux résultats donnés par ISAIEV, nous avons trouvé que le D-galactose retarde nettement l'hydrolyse du maltose par la Taka-diaстase.

Pour préciser nos résultats nous donnons ci-dessous les chiffres obtenus dans la comparaison des pouvoirs inhibiteurs du glucose, du fructose et du galactose employés à la

dose de 5 %, la concentration du maltosé étant dans tous les cas égale à 3 % et la dose d'enzyme égale à 1 %. Les matras contenant les différentes liqueurs étaient maintenus côte à côte à une température variant de 24 à 27°. (Puisqu'il s'agissait d'une simple comparaison entre les vitesses d'hydrolyse, les variations de température importaient peu).

Voici le tableau des résultats :

Temps en heure	Poids de maltose hydrolysé dans 100 cm ³ de solution			
	Maltose	Maltose + glucose	Maltose + fructose	Maltose + galactose
4	0 gr, 26	0 gr, 19	0 gr, 22	0 gr, 20
10	0 gr, 66	0 gr, 42	0 gr, 55	0 gr, 50
18	1 gr, 22	0 gr, 75	0 gr, 96	0 gr, 88

Il ressort de ces expériences que, dans les conditions où nous avons opéré, les trois oses se classent d'après leur pouvoir innibiteur croissant dans l'ordre suivant : fructose, galactose, glucose.

Nous nous sommes demandé si la raison des divergences entre les résultats d'ISAIEV et les nôtres, relativement à l'action du D-galactose, ne proviendrait pas d'une différence entre les liqueurs diastasiques dont il s'était servi et les nôtres. Nous avons en effet constaté, au cours d'expériences relatives à l'action des inhibiteurs sur l'hydrolyse du sac-

charose que les retards observés étaient totalement différents selon que l'enzyme utilisé était une saccharase de levure préparée selon la technique de Summer ou la saccharase de la Taka-diastase.

La concentration du saccharose était la même dans toutes nos expériences : 4 gr, 8 % et celle des différents oses était de 10 gr. %. La dose d'enzyme était déterminée de telle manière que l'hydrolyse présentait une phase assez longue de vitesse constante.

Voici deux expériences, entre autres, qui nous permettront de tirer des conclusions intéressantes, et particulièrement, de montrer la très grande différence entre les pouvoirs inhibiteurs relatifs des trois oses considérés, selon qu'il s'agit de l'une ou l'autre des deux invertases.

(voir tableaux suivants).

Saccharase de levure

Temps en 1/4 d'heure	Poids de saccharose hydrolysé dans 100 cm ³ (en grammes)			
	S.	S + Gl.	S + Gal.	S + F
1	0.20	0.12	0.03	0.11
2	0.41	0.23	0.07	0.21
3	0.62	0.34	0.11	0.32
4	0.82	0.46	0.15	0.43
5	1.02	0.57	-	0.54
6	1.23	0.68	0.22	0.65
7	1.45	0.80	-	0.76
8	1.65	0.92	0.30	0.86
9	1.85	1.03	-	0.97
10	2.06	1.14	0.38	1.08
11	2.27	1.26	-	1.19
12	2.48	1.37	0.46	1.30
14	2.89	1.60	0.53	1.51
16	3.31	1.84	0.61	1.73
18	3.67	2.07	0.70	1.94
20	3.97	2.30	0.78	2.15
96 (24h.)	4.76	4.60	3.02	4.55

Taka-diaastase Parke et Davis

Temps en 1/2 h.	Poids de saccharose hydrolysé dans 100 cm ³ (en grammes)			
	S.	S + Gl.	S + Gal.	S + F
1	0.24	0.13	0.15	0.18
2	0.47	0.25	0.31	0.35
3	0.70	0.37	0.46	0.53
4	0.94	0.50	0.61	0.72
5	1.17	0.62	0.75	0.90
6	1.41	0.74	0.91	1.09
7	1.64	0.87	1.06	1.28
8	1.88	1.00	1.21	1.47
99	2.11	1.12	1.36	1.66
10	2.35	1.24	1.50	1.84
11	2.58	1.37	1.65	2.02
12	2.81	1.49	1.80	2.21
13	3.02	1.62	1.96	2.40
14	3.22	1.75	2.12	2.58
48 (24h.)	4.03	3.80	3.92	4.00

Ainsi : a) pour la saccharase de levure, les rapports entre les vitesses d'hydrolyse du saccharose seul et du saccharose additionné de glucose, de galactose ou de fructose, sont respectivement de

1,7

5,6

1,9 en moyenne

b) pour la Taka-diastrase, on obtient :

1,8

1,5

1,3 en moyenne.

(A. de Grandchamp-Chaudun et M.T. Moreau C.R. 235, P.552-554).

Il ressort donc que là, l'action inhibitrice pour une réaction déterminée dépend essentiellement de la source de l'enzyme, or on sait qu'il existe plusieurs sources différentes de taka-diastrase, nous n'avons pu malheureusement nous procurer que la Taka-diastrase Parke et Davis, mais il est possible que celle utilisée par J.V. ISAIEV venait d'une source différente ce qui expliquerait, peut-être, la différence existant entre ses résultats et les nôtres.

CONCLUSION GENERALE

De toute cette étude, nous pouvons tirer les conclusions suivantes relatives à l'hydrolyse du maltose par la Taka-diaстase.

1^{re}) Pour une concentration enzymatique E donnée, la concentration du maltose non hydrolysé So-x qui reste en solution quand la réaction change d'ordre est proportionnelle à la concentration enzymatique et indépendante de la teneur initiale So en substrat. Cette concentration So-x du maltose non hydrolysé est donc celle à laquelle on obtient la vitesse maximum de la catalyse enzymatique.

2^{de}) Dans le cas où la concentration enzymatique est égale à 1 gr. % et la concentration de maltose non hydrolysé So-x étant S₁, concentration que nous appellerons "concentration critique", et qui peut-être considérée comme une constante caractéristique de l'enzyme, le rapport $\frac{1}{S_1}$ peut servir à déterminer le nombre de zones de la réaction.

Si $\frac{1}{S_1} < \frac{E}{S_0}$ la réaction présente deux zones : une zone dont la cinétique est d'ordre 0, (la durée de cette zone dépend de la concentration du substrat), suivie d'une zone dont la cinétique est d'ordre I, comme le prouvent les calculs.

Si $\frac{1}{S_1} > \frac{E}{S_0}$, l'hydrolyse présente dès le début une cinétique d'ordre I.

3^e) Le glucose produit de la réaction retarde l'hydrolyse du maltose, mais ne modifie pas de façon sensible la concentration du maltose $S_0 - x$ restant en solution, quand la vitesse d'hydrolyse commence à décroître. Il semblerait donc que le glucose ne soit pas un inhibiteur compétitif et qu'il agirait plutôt en diminuant l'action du co-enzyme dont il bloquerait en partie l'activité sans pour cela modifier l'affinité de l'apo-enzyme pour son substrat le maltose.

4^e) Contrairement à ce qu'ont trouvé certains auteurs, ISAIEV en particulier, le galactose se révèle inhibant l'hydrolyse du maltose par la Taka-diaстase, PARKE et DAVIS, comme le fait le fructose.

- (1) AP. DUBRUMFAUT : Ann. chim. et phys. (3) 21, 178 (1847)
- (2) C.O. SULLIVAN : J. chem. Soc. 25, 579 (1872).
- (3) F. MUSCULUS et D. CRUBER : Z physiol. chem. 2, 177
(1878-1879)
- (4) F. MUSCULUS et J. VON MERING : Z physiol. chem. 2, 403
(1878-1879).
- (5) H.T. BROWN et J. HERON : Ann. 204, 228 (1880).
- (6) J. VON MERING : Z physiol chem. 5, 185 (1881).
- (7) E. BOURQUELOT : Compte-rendu 97, 1322 (1883).
- (8) O. KELLNER, Y. MORI, M. NAGAOKA : Z physiol chem, 14, 297
(1890).
- (9) R. GEDUL : Koch's Jahresberichte Gärungs : Organismen,
p. 220, (1891).
- (10) F. RÖHMANN : Ber 27, 3251 (1894).
- (11) E. FISCHER : Ber 27, 2985, 3479 (1894)
- (12) WILLSTÄTER et M. ROHDEWALD : Z physiol chem, 209, 33 (1932).
- (13) M.H. BIERRY : C.R. 148, 949 (1909).
- (14) R. WILLSTÄTER et E. BAMANN : Z physiol chem. 151, 273 (1926)
- (15) J. FEIGENBAUM : Sciences 96, 521, (1942).
- (16) LEIBOWITZ : Z physiol chem. 149, 184 (1925).
- (17) E. FISCHER et E.F. ARMSTRONG : Ber 35, 3141 (1902).
- (18) C. NEUBERG et E. HOFMANN : Biochem Z 252, 434 (1932)
- (19) R. WEIDENHAGEN : Z physiol chem. 216, 255 (1933).
- (20) H. PRINGSHEIM et F. LOEW : Z physiol chem. 207, 241 (1932)
- (21) S. HESTRIN : Enzymologia 8, 193 (1940)
- (22) NEUBERG et HOFMANN : { Biochem Z 252, 434 (1932)
{ Biochem Z 272, 133 (1934)
- (23) FISCHER : Chem cent. 1896, I, 499.

- (24) E.F. ARMSTRONG : Proc. Roy. Soc. London B 73, 516 (1904)
 - (25) Melle PHILOCHE : Recherches physico-chimiques sur l'amy-
lase et la maltase (thèse 1908)
 - (26) WILLSTÄTTER, R. KULN et H. SOBOTKA : Z physiol chem,
134, 224 (1924)
 - (27) WILLSTÄTTER, T. OPPENHEIMER et W. STEIBEL : Z physiol chem.
110, 232 (1924)
 - (28) WILLSTÄTTER et BAMANN : Z physiol chem. 151, 242 (1926)
 - (29) V.J. ISAEV : Inst. Brewing 32, 552 (1926)
 - (30) L. MICHAELIS et M.L. MENTEN : Biochem Z 49, 333 (1913)
 - (31) A. GOTTSCHALK : The enzymes - chemistry and mechanism of
action. B. Summer et Myrbach tome I
partie I, p. 568-570 (1952).
 - (32) HALDANE : Enzymes London 1930 p. 43
 - (33) V.J. ISAEV : J. Inst. Brewing 32, 552 (1926)
 - (34) Karl NEUBERG et INESMANLD : The Enzymes-chemistry and
mechanism of action. B. Summer et
Myrbach p. 540 tome I, partie I
(1952).
 - (35) J.D. OGLE et A. TYTELL : Arch of Bioch and phys. 42 N° 2
(1953).
-

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

Monographie des fructosanes des monocotylédones

Vu et approuvé :

Paris, le 6 juin 1954

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

J. PERÈS

Vu

et permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

Jean SARRAILH

